

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

« ____ » _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва біоінсектициду. Дільниця біосинтезу»

Виконав:

студент IV курсу, групи БТ-62

Поворозний Іван Валерійович _____

Керівник:

Зав. каф. промислової біотехнології, д.т.н., доц.

Тодосійчук Тетяна Сергіївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Ст. викладач каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н. _____

Жукова Вероніка Сергіївна

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020 р.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Порозний Іван Валерійович

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біоінсектициду. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д.т.н., доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *B.thuringiensis* H1800 / 15; середовище культивування - дріжджеполісахаридне; ферментер для промислового культивування - об'єм 1м³; параметри культивування: t = 29±1 °С, рН 6,8—7,2, τ = 35-40 год; кінцевий продукт – розфасована у бутілі стандартизована суспензія клітин штаму *B.thuringiensis* H1800 / 15.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва препарату біоінсектициду; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва;

скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції для виробничого біосинтезу, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду реактору зі змішувачем – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.03.20-25.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.03.20-15.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	15.04.20-30.04.20	
4.	Технологічна частина	30.04.20-15.05.20	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.20-30.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	15.05.20-30.05.20	
7.	Подання дипломного проєкту до екзаменаційної комісії	05.06.20-10.06.20	

Студент

Іван ПОВОРОЗНИЙ

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва біоінсектициду.
Дільниця біосинтезу»**

Київ – 2020 р.

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить 96 с., 4 рис., 3 табл., 1 схема, 60 посилань.

Робота присвячена розробці технології виробництва біоінсектициду для захисту рослин та ділянки біосинтезу.

В якості продуцента дельта-токсину, бета-токсину та спор використовується штам *Bacillus thuringiensis* H_{1800/15}, так як зазначений штам володіє вираженими ентомопатогенними властивостями, проявляє резистентність до бактеріофагів, не проявляє негативної дії на ентомофауну та людину.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схема виробництва ентомопатогенного препарату. Розраховано та вибрано ефективне обладнання для ділянки біосинтезу. Наведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки виробничого ферментера.

Розроблена технологія виробництва біоінсектициду, що відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, техніка безпеки та охорона праці відповідає усім нормам.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: БІОІНСЕКТИЦИД, ДЕЛЬТА-ТОКСИН, *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *THURINGIENSIS*, ЕНТОМОПАТОГЕННА ДІЯ, ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ, ФЕРМЕНТЕР.

					ДП.6212.00.000.ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Поварозний І.В.				Д	5	96
Консульт.								
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ABSTRACT

The degree project contains 96 pages, 4 figures, 3 tables, 1 scheme, 60 references.

The work is devoted to the development of technology for the production of bioinsecticide for plant protection and biosynthesis.

As a producer of delta-toxin, beta-toxin and spores used strain *Bacillus thuringiensis* H_{1800/15}, as this strain has pronounced entomopathogenic properties, shows resistance to bacteriophages, has no adverse effects on entomofauna and humans.

The technological and hardware scheme of entomopathogenic drug production is substantiated and presented in the work. Efficient equipment for the biosynthesis site has been calculated and selected. Technological, constructive and thermal calculations of the production fermenter are given.

Developed technology for the production of bioinsecticide that meets sanitary and environmental standards, safety and labor protection meets all standards.

KEY WORDS: BIOINSECTICIDE, DELTA-TOXIN, BACILLUS THURINGIENSIS VAR. THURINGIENSIS, ENTOMOPATHOGENIC ACTION, PRODUCTION BIOSYNTHESIS, FERMENTER.

					ДП.6212.00.000.ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Поварозний І.В.				Д	6	96
Консульт.								
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ I. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1. Основні промислові продуценти.....	11
1.2. Систематичне положення.....	13
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.4. Культуральні ознаки.....	15
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	16
1.6. Поширення в природі.....	18
РОЗДІЛ II. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	19
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	19
2.2. Схема хімічних перетворень.....	20
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	23
2.4. Методи очистки цільового продукту.....	24
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси...	25
РОЗДІЛ III. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ...	27
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	27
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму.....	29
3.3. Схема отримання продуценту, що використовується в роботі.....	33
3.4. Особливості технології або апартурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента.....	34
РОЗДІЛ IV. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	36
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	36

					ДП 6212. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Поворозний І.В.				Д	7	96
Консульт.								
Керівник		Тодасічук Т.С.						
Затвер.								
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	37
4.3. Опис технологічного процесу	40
4.4. Матеріальний баланс.....	53
4.5. Контроль виробництва.....	54
РОЗДІЛ V. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	60
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарат	60
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	63
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	77
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	80
ВИСНОВКИ.....	86
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	88
ДОДАТОК А.....	94
ДОДАТОК Б.....	95
ДОДАТОК В.....	96

ВСТУП

Інсектициди – це препарати, які призначені для знищення комах, їхніх яєць, а також личинок. Інсектициди бувають хімічні або біологічні та застосовуються в сільському господарстві, медицині, промисловості або у побуті. Сфери застосування інсектицидів досить різноманітні і враховуючи темпи зростання населення, а відповідно і їхніх потреб у продовольстві у сучасному світі, який поступово переходить до все більш екологічних рішень та технологій, неможливо не звернути увагу на біологічні інсектициди, які володіють широким спектром дії, що дозволяє їм ефективно боротися з великою кількістю шкідників.

Основним недоліком хімічних інсектицидів є їх несприятлива дія як для людей, так і для навколишнього середовища: потрапляння у водоймища, накопичення в тваринних і рослинних продуктах та в кормах, а також отруєння бджіл, джмелів і інших комах-обпилювачів. У зв'язку з цим у цивілізованому світі почали використовувати інсектициди на основі спор *Bacillus thuringiensis*, які не впливають на інші організми, і вважаються більш екологічно чистими.

Біологічні інсектициди – це біопрепарати, які містять вузько-спеціалізовані мікроорганізми і продуковані ними специфічні біотоксини направленої дії, призначені для боротьби з імаго і личинками шкідливих комах, кліщів і комарів. До переваг біоінсектицидів відносять те, що вони не викликають резистентності у шкідливих організмів, що дозволяє ефективно їх використовувати протягом багатьох років, без збільшення дози діючої речовини, а також вони є безпечними для навколишнього середовища, тварин, людини і корисної ентомофауни, в тому числі для бджіл.

Враховуючи те, що ціна на інсектициди біологічного походження, є не надто високою, а частонавіть нижчою ніж на препарати хімічного

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розробив	Паворозний І.В.						
Консульт.							
Керівник	Тодасічук Т.С.						
Затвер.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	9	96

походження, тому перевага їх застосування є очевидною, так як вирішує більшість проблем, з якими зіштовхуються при використанні синтетичних інсектицидів. Особливо це актуально в сфері агрокомплексу, а так як Україна по суті є аграрною державою, то для нашої країни це питання є досить важливим.

Тому, метою проекту було розробити ефективну і економічну вигідну технологію виробництва біоінсектициду на основі *B.thuringiensis* з підвищеним рівнем синтезу δ -ендотоксину та β -екзотоксину, як основних діючих речовин препарату. В якості продуцента було обрано штам *B.thuringiensis* Н₁800/15, який отриманий шляхом індукованого мутагенезу.

Завданнями, які поставлені для досягнення даної мети є:

- порівняння мікроорганізмів потенційних продуцентів біоінсектициду, що можуть бути використані для отримання ентомопатогенного комплексу токсинів та вибір найбільш перспективного та такого, що відповідає всім вимогам процесу;
- встановлення його фізіолого-біохімічних та морфологічних ознак, аналіз методів отримання високопродуктивних промислових штамів продуцента;
- вибір способів виділення та очистки продукту, обґрунтування вибору оптимальної технології за критеріями економічності, ефективності та простоти реалізації;
- розробка технологічної та апаратурної схем виробництва препарату;
- обґрунтування вибору ферментера для біосинтезу його розрахунок та конструкційні особливості.

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Ентомопатогенну дію на шкідників рослин проявляють численні групи живих організмів, такі як: віруси, бактерії, нематоди і грибки. Проте основним продуцентом інсектицидів біологічного походження є різноманітні штами *Bacillus thuringiensis*, які використовуються для виробництва препаратів захисту рослин на основі екзоспор даного продуценту. *B.thuringiensis* – вид грампозитивних, спороутворюючих ґрунтових бактерій. Клітини і специфічний кристалічний білковий δ -ендотоксин виявляють інсектицидну дію по відношенню до гусениць багатьох класів комах [1]. Вони знайшли широке застосування в біозахисті рослин з огляду на їх високу специфічність по відношенню до комах-шкідників, відсутність до них звикання, низькою небезпекою через відсутність біологічних ефектів для хребетних і інших загонів комах, високій технологічності. Розроблено та широко застосовуються ГМ рослини (кукурудза, картопля і бавовна), що несуть *cry*-гени і відповідно продукують *Cry*-токсини, що володіють високою стійкістю до комах-шкідників[2].

Розміщення *B.thuringiensis* як окремого виду до роду *Bacillus* було суперечливим з часу публікації *The Genus Bacillus* у 1973 та посібника з детермінативної бактеріології *Bergey* у 1974 р. Рід *Bacillus* - один із найрізноманітніших родів класу *Bacilli*. Аеробні та факультативно анаеробні, паличкоподібні, грампозитивні спороутворюючі бактерії із вмістом G + C в межах 32–69% . На основі філогенетичної неоднорідності запропоновано вісім родів класу Бацили(*Bacilli*): *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus* та *Gracilibacillus*. Багато видів цих родів мають практичне значення, оскільки виробляють

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розробив	Поворозний І.В.						
Консульт.							
Керівник	Тодосіичук Т.С						
Затвер.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

антибіотики та пептиди з антимікробною, протівірусною та протипухлинною активністю. Вони також синтезують термостабільні ферменти та молекули, які можуть пригнічувати ґрунтові фітопатогенні організми.

У монографії *The Genus Bacillus, Gordon* розглянуто *B.thuringiensis*(Bt), як різновид *B.cereus*(Bc) разом з *B.anthraxis* (Ba) та *B.mycoides* (Bm). Безумовно, Bt, Ba і Bc мають багато загальних фенотипових і генотипових властивостей, якщо три види були розміщені в одній групі під назвою *Bacillus cereus* (Bc). *B.thuringiensis* має різноманітні особливості, включаючи здатність жити у навколишньому середовищі, вільному та незалежному від інших грампозитивних спороутворюючих бацил, вироблення ентомоцидних білків параспорових кристалів та виживання в унікальній екологічній ніші - в середній кишці та гемоцелі комах.

Цікаво, що *B.thuringiensis* спочатку вважався умовно-патогенним збудником у тварин та людини. Два штами *B.thuringiensis* - *B.thuringiensis subsp. Konkukian* та *B.thuringiensis Al Nakam* були позначені як збудники людини. Однак аналіз послідовності не показав наявності інсектицидних генів, що є на хромосомі або самотній одиночній плазміді pBT9727.

Більше не було проведено жодних інших досліджень, які характеризують *B.thuringiensis* як умовно-патогенного збудника людини або теплокровних тварин[3].

Промислове виробництво ентомопатогенних препаратів полягає в їх культивуванні з метою отримання комплексу спор, екзо- і ендотоксинів з подальшою їх очисткою і стабілізацією. При цьому ставиться завдання одержання максимального титру клітин в культуральній рідині й нагромадження токсину. Вимоги до промислових штамів ентомопатогенних бактерій: належність штаму до певного серотипу, висока вірулентність і продуктивність на промислових середовищах, стійкість до комплексу фагів. Технологія виробництва включає усі стадії, типові для біотехнологічного виробництва.

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

Відповідно виходячи з отриманої інформації для виробництва біологічного інсектициду (аналога до препарату «Колорадоцид») будемо використовувати найбільш підходящий штам *B.thuringiensis* H₁800/15, який задовольняє вимоги і можливості виробництва.

1.2 Систематичне положення продуцента

В даному проекті використовується організм-продуцент біоінсектициду *B.thuringiensis* H₁800/15, первісно ідентифікований як *B.thuringiensis* var.*thuringiensis*.

За науковою класифікацією продуцент біоінсектициду має таке систематичне положення:

Домен: Бактерії(*Bacteria*)

Тип: Фірмікути(*Firmicutes*)

Клас: Бацили(*Bacilli*)

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: Бацили(*Bacillus*)

Вид: *Bacillus thuringiensis* [4]

Так як, *B.thuringiensis* H₁800/15 відноситься до роду *Bacillus* за визначником Берджі належать до групи 19 «Грампозитивні палички, що утворюють ендоспори»[5].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

За визначником Берджі організм-продуцент ентомопатогенного препарату характеризується так: прямі палички розміром 0,5-2,5 – 1,2-10 мкм із заокругленими чи «обрубленими» кінцями, часто знаходяться в парах або ланцюжках. Грампозитивні, факультативні анаероби, рухомі за рахунок перетрихціальних джгутиків. Утворюють овальні ендоспори або іноді

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

сферичні чи циліндричні, які стійкі до багатьох негативних факторів. В клітині утворюється не більше однієї спори[6].

На рисунку 1.1 зображено спори та паспоральні кристали *B.thuringiensis*.

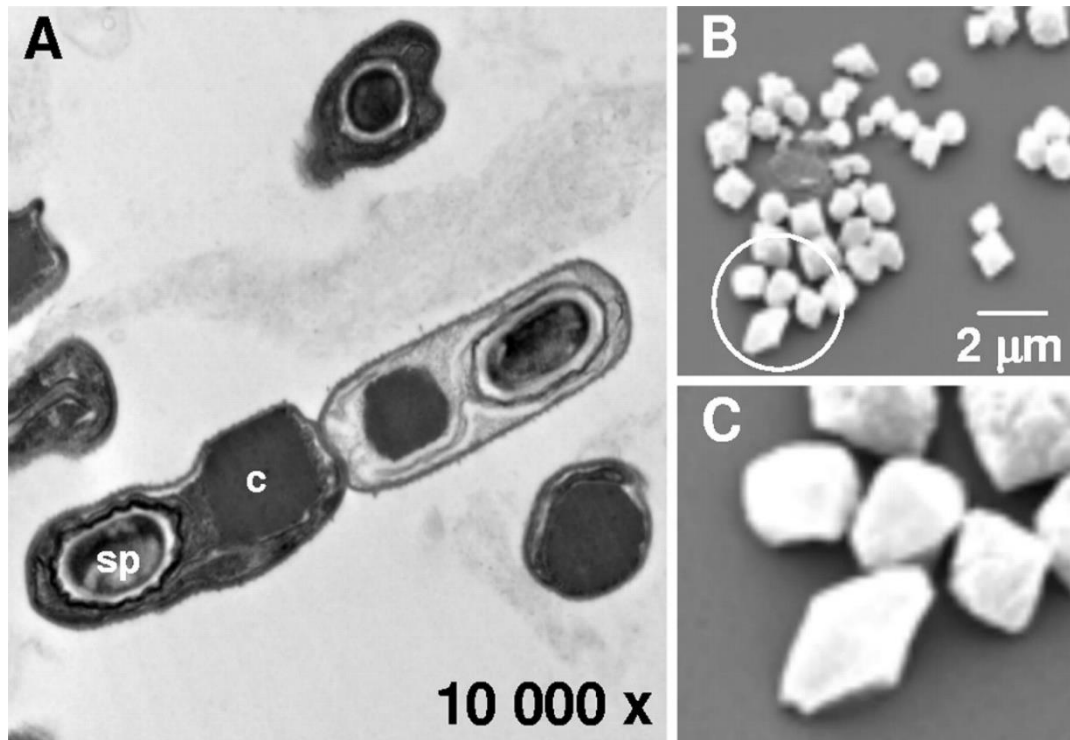


Рис. 1.1 Електронна мікрофотографія спор *B. thuringiensis* (A) та очищених Cry-білків (B і C)[7].

Життєвий цикл продуцента характеризується двома фазами, які включають вегетативний поділ клітин та розвиток спор, інакше їх називають циклом спороношення. Вегетативна клітина має стрижневу форму (довжиною 2–5 мкм та шириною близько 1,0 мкм) та ділиться на дві рівномірні дочірні клітини шляхом утворення перегородки при поділі, розпочатої посередині вздовж плазматичної мембрани. Споруюляція, з іншого боку, передбачає асиметричний поділ клітин і складається з семи стадій, які включають - (стадія I) формування осьової нитки, (стадія II) утворення перегородки передньої опори, (стадія III), поглинання та перша поява параспоральних кристалів , (стадії IV до VI) утворення екзоспорию, примордіальної клітинної стінки і спорових оболонок, що супроводжуються

трансформацією спорового нуклеоїду та (стадія VII) дозрівання спори та спорангіального лізису. Виробництво кристалічних білків *B.thuringiensis* під час споруляції - це унікальне генетично регульоване біологічне явище, яке, ймовірно, знімає стрес фізичним шляхом, компенсуючи втрати води утворенням спор і надає додаткову перевагу виживання, здійснюючи смертельну дію проти комах-господарів. В свою чергу, токсична дія забезпечує достатню кількість поживних речовин-господарів, щоб забезпечити проростання бактеріальної спори та повернення її до вегетативного росту[8].

1.4 Культуральні ознаки

До культуральних особливостей відносяться характерні особливості росту мікроорганізмів на щільних й рідких поживних середовищах. На поверхні щільних поживних середовищ, у залежності від посіву, мікроорганізми можуть рости у вигляді колоній, штрихів або суцільного газону. Наш продуцент на МПА і подібних по складу агаризованих середовищах утворює круглі, плоскі, гладкі колонії. Колонією називається ізольоване скупчення клітин одного виду, які вирости з однієї клітини (клон клітин). Культуральні особливості *B.thuringiensis* на деяких агаризованих середовищах складають їх важливу відмінну особливість від інших видів[9].

В залежності від того, де росте мікроорганізм (на поверхні щільного поживного середовища або в його товщі), розрізняють поверхневі, глибинні і придонні колонії. Колонії, що вирости на поверхні середовища(стосується продуцента екзотоксину), відрізняються різноманітністю і є видоспецифічними.

При описі колоній враховують такі ознаки:

- Форму колонії - округла, амебоподібна, ризоїдна, неправильна;
- Розмір колонії - дуже дрібні (0,1-0,5 мм), дрібні (0,5-3 мм), середніх розмірів (3-5 мм) і великі (понад 5 мм в діаметрі);

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

- Поверхня колонії - гладка, складчаста, шорсткувата, зморшкувата, з концентричними колами чи радіально покреслена;
- Профіль колонії - плоский, опуклий, конусоподібний;
- Прозорість - тьмяна, матова, блискуча, прозора, борошниста;
- Колір колонії (пігментація) - безбарвна або пігментована (біла, золотиста, червона, чорна), особливо відзначається виділення пігменту в середовище зі зміною його забарвлення;
- Край колонії - рівний, хвилястий, зубчастий, тощо;
- Структуру колонії - однорідна, дрібно- або грубозерниста, стрічковата; край і структура колонії визначається за допомогою лупи або при малому збільшенні мікроскопа, помістивши чашку Петрі з посівом на столик мікроскопу кришкою вниз;
- Консистенцію колонії - визначають доторкаючись до поверхні петлею: колонія може бути щільною, м'якою, чм вростаючою в агар, слизовою (тягнеться за петлею), тендітної (легко ламається при зіткненні з петлею)[10].

Розглянувши вище перелічені ознаки можна зробити висновок, що колонії *B.thuringiensis* - організма продуцента екзотоксину мають: забарвлення від біловато-сірого до рожевого; колонії в середовищі не врастають. Край колоній гладкий, хвилястий або слаботоризоїдний, при мікроскопії - ризоїдний з тяжами, що розходяться. В агаровому стовпчику при посіві уколом – переважно поверхневий ріст. Стовбчик желатину розріджується досить інтенсивно і рівномірно з поверхні, а в МПБ - сильне помутніння з просвітленням та утворенням щільного придонного осаду[11].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

B.thuringiensis є факультативним анаеробом, грампозитивний, має товсту клітинну стінку, яка складається з пептидоглікану (амінокислотний поліпептид і цукор). Факультативно-анаеробний характерний аспект ВТ

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

полягає в тому, що він дозволяє бактеріям продукувати АТФ за допомогою аеробного дихання, якщо присутній кисень, однак може також використовувати інші гази за допомогою ферментації або анаеробного дихання[12]. Периплазма, необхідна для біосинтезу і захисту, знаходиться між клітинною стінкою і плазматичною мембраною. Оптимальний температурний діапазон росту 26–32 ° С; оптимальний рН 6,8-7,2. Відношення до підвищеної температури і рН сильно варіює. Бактерії виду *B. thuringiensis*, як правило, володіють активними протеолітичними, алілолітичними і гемолітичними властивостями. Досить характерним також є утворення фосфоліпази С у більшості штамів. Денітрифікація та реакція ВП позитивні, індол не утворюють. Зазвичай засвоюються з утворенням кислоти без газів: глюкоза, фруктоза, трегалоза та гліцерин. Не засвоюються: арабіноза, галактоза, ксилоза, , манніт, лактоза, дульцит та інулін. Більшість штамів не володіють інвертазою. Культури *B.thuringiensis* потребують для свого розвитку різних амінокислот, відмічається також і потреба у вітамінах. По даних Багдасарян С.Н. (1998), найчастіше для росту серотипу *thuringiensis* використовує аргінін, аланін, метіонін, треонін, аспарагінова і глютамінова кислоти[13].

Виходячи з фізіолого-біохімічних ознак продуцента та життєвого циклу найбільш ефективним буде культивування на дріждже- полісахаридному поживному середовищі, так як його склад цілком задовольняє потреби продуцента у поживних і мінеральних речовинах , і є відносно дешевим і доступним варіантом. Основними складовими цього середовища є кормові дріжджі (як джерело білку та жирів), та кукурудзяне борошно (як джерело азоту і вуглеводів) додатково вносяться мінеральні речовини для більш інтенсивного процесу . Дане середовище готується із розрахунку, що процес спороношення розпочався за браку поживних і мінеральних сполук, тобто IV-VI стадії клітинного циклу, так як тут відбувається утворення параспоральних кристалів, що мають ентомопатогенну дію[14].

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

1.6 Поширення в природі

B.thuringiensis мікроорганізм природнім середовищем існування якого є ґрунт . Також *B. thuringiensis* можна зустріти на різних субстратах, таких як вода, рослинні поверхні, мертві комахи, зерновий пил, павучі павутини та на зерні що зберігається . Ця бактерія також демонструє високу генетичну мінливість і є широко поширеною в природі. Генетична мінливість між різними ізолятами була вивчена за допомогою ланцюгової полімеразної реакції. Даний організм є ентомопатогенним видом і його цикл розвитку включає паразитичне проникнення в організм носія, з подальшою його смертю і використанням його решток як субстрату для росту і розвитку[15].

Безпечність інсектицидів на основі бактерій для рослин надає можливість використовувати препарати в будь-яку вегетативну фазу росту рослин.

Бактерії групи *B.thuringiensis* виявляють свою активність у відношенні до понад 400 видів комах, включаючи шкідників садів, лісу, полей та виноградників; найефективніші дані препарати у боротьбі з листогризучими шкідниками

На сьогоднішній день відомо більше 100 штамів *B.thuringiensis*, які об'єднані у тридцять груп за біохімічним та серологічним показниками.

Із-за слабкої стартової дії мікробіопрепаратів їх застосування економічно виправдано лише при середній численності шкідників (не перевищує порогову більше ніж в 3 рази). Їх застосовують в боротьбі з такими класами комах: *Lepidoptera* і *Diptera*.

На сьогоднішній день найбільш широке застосування в боротьбі з шкідниками садів, лісів і полів отримали біопрепарати, створені на основі кристалоутворюючих бактерій із групи *B. thuringiensis var. thuringiensis* (продуцент нашого ентомопатогенного препарату) і *B. thuringiensis var. Kurstaki*[16].

					ПБ.БТ6212.00.000.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

В результаті технологічного процесу отримуємо готовий препарат що, являє собою суспензію спор та комплекс ентомоцидних токсинів, головною діючою складовою якого є δ -ендотоксин. δ -ендотоксин має білкову природу та відноситься до ендотоксинів, а його структура та будова відрізняються в залежності від штаму з якого виділяється токсин.

Виділені з безлічі штамів *B. thuringiensis*, білки(ендотоксини) в відповідності до їх токсичності та структурної близькості можна поділити на чотири основні класи: CryI, CryII, CryIII і CryIV. Білки CryI токсичні для лускокрилих (Lepidoptera), CryII – для лускокрилих (Lepidoptera) та двокрилих (Diptera), CryIII – для жуків(Coleoptera), CryIV – для двокрилих (Diptera). Для даних токсинів показано чітко виражену доменну структуру.

C-кінцевий район є досить консервативним серед різних класів ентомоцидних білків. Методом рентгеноструктурного аналізу була визначена третинна структура в для двох ентомоцидних білків: дельта-ендотоксину Cry3Aa (67 кДа,*ssp.tenebrionis*), та протоксину Cry1Aa (65 кДа,*ssp.kurstaki*). При цьому, що ідентичність даних білків за амінокислотної послідовності становить лише 33%, їх третинні структури досить подібні. Вирівнювання первинної структури інших ендотоксинів і розрахунок передбачуваної вторинної структури дозволяє припустити, що всі вони мають принципово подібне укладання поліпептидних ланцюгів [16].

Третинна структура молекули «істинних токсинів» представлена трьома доменами (Додаток Б). Перший, N-кінцевий, побудований із 7 α -спіралей, при цьому переважно гідрофобна п'ята α -спіраль оточена 6 амфіфільними так, що гідрофобні поверхні останніх повернені до α -5. Спіралі α -3 – α -7

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Паворозний І.В.			РОЗДІЛ 3. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	19	96
Керівник		Тодасічук Т.С.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

мають достатню довжину (більше 30 Å), щоб пронизати двохшарову цитоплазматичну мембрану. Найбільша спіраль α -6 довга (45 Å).

Другий домен складається з трьох β -складчастих листів, зімкнутих так, що в перерізі трикутник. Два перших β -складчастих листа складаються з чотирьох антипаралельних складок; третій - з трьох β -складок та однієї невеликої α -спіралі (α -8). У складі кожного β -листа поміж двома внутрішніми нитками утворюється петля. Ці петлі зібрані досить близько одна до одної на вершині молекули. Третій домен являє собою "сендвіч" з двох антипаралельних β -складчастих листів. Незважаючи на досить чітко виражену доменну структуру, в ході денатурації молекула ендотоксів веде себе, ніби єдине ціле [17]. Ця цілісність забезпечується досить тісними міждоменними контактами. Найбільш сильні контакти виявлені між першим і другим доменами, а дещо менша площа контакту між доменами I і III. У взаємодіях цих доменів велику роль відіграють водневі зв'язки і сольові містки. Другий і третій домени контактують доволі невеликою поверхнею, так як їх зв'язок зумовлений, в основному, гідрофобними взаємодіями.

2.2 Схема хімічних перетворень

У процесі культивування культури *B.thuringiensis* на поживному середовищі, що містить кормові дріжджі і кукурудзяне борошно як джерела поживних речовин. Компоненти поживного середовища можуть утилізуватись шляхом перетворення амінокислот як складових частин кормових дріжджів до пірувату, який у свою чергу входить до ЦТК, що забезпечує клітину необхідною енергією і «будівельним» матеріалом для синтезу необхідних аміно- і нуклеїнових кислот.

β -екзотоксин і δ -ендотоксин, як основний продукт біосинтезу *B.thuringiensis* мають білкове походження, таким чином розглянемо хімічне перетворення пірувату, як основного продукту розщеплення вуглеводів, до амінокислот, які позпосередньо утворюють токсини[18].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

На першій стадії розщеплення глюкози відбувається за допомогою гліколізу(шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса), в результаті отримуємо піровиноградну кислоту(піруват), який ферментативно перетворюється на Ас-Коа, що входить до другого етапу перетворення – циклу Кребса(цикл трикарбонових кислот). В результаті послідовних перетворень із Ас- Коа синтезується оксалоацетат і α -кетоглутарат, які з'єднуючись з аміаком утворюють відповідно аспарагінову і глутамінову кислоти, які при трансамінуванні є основою для інших амінокислот. На Додатку В зображено всі можливі шляхи синтезу амінокислот із вуглеводів.

Біосинтез білка у *B.thuringiensis* проходить за загальною схемою у 4 взаємозалежні етапи :

I етап. Транспірація - це передача інформації про структуру білка від молекули ДНК на і-РНК. Цей процес здійснюється за участю спеціальних ферментів й відбувається так: подвійний ланцюг в деякому відрізьку роз'єднується і вздовж одного із ланцюгів ДНК починається синтез молекули і-РНК за принципами комплементарності. Певна ділянка ДНК є матрицею для відповідної їй і-РНК. і-РНК після транскрипції зазнають процесів сплайсингу - із новоутвореної і-РНК вирізаються неінформаційні фрагменти - інтрони та зшиваються інформаційні ділянки - екзони.

Екзони - це послідовність нуклеотидів в генах, що кодують синтез білка.Інтрони - послідовність нуклеотидів ДНК, які не кодують синтез білка (неінформативна ділянка). Спейсери - це частина ДНК, що взагалі не несе ніякої генетичної інформації.Синтезовані молекули і-РНК переходять з ядра в цитоплазму, а ДНК відновлює свою початкову структуру.

II етап. Активація амінокислот. Даний процес відбувається в цитоплазмі. Активовані молекули амінокислот з'єднуються із молекулами т-РНК, кожній з 20 амінокислот відповідає певна т-РНК. У молекулі т-РНК присутні дві важливі ділянки: до однієї із них прикріплюється відповідна амінокислота, а інша містить триплет нуклеотидів, що відповідає коду даної

амінокислоти в молекулі і-РНК. Активовані амінокислоти, сполучені з т-РНК далі надходять до рибосом.

III етап. Трансляція – це синтез поліпептидних ланцюгів, що відбувається так: молекула і-РНК рухається поміж двома субодинами рибосом та до неї послідовно приєднуються молекули т-РНК із амінокислотами. При цьому за принципом комплементарності кодони і-РНК вступають в зв'язок із антикодонами т-РНК. Послідовність розташування амінокислот визначається порядком чергування триплетів в молекулі і-РНК. Амінокислоти утворюють поліпептидні зв'язки за рахунок енергії АТФ й у результаті з рибосоми сходить поліпептидний ланцюг.

IV етап. Термінація - це утворення вторинної та третинної структур білкової молекули. Цей етап здійснюється у цитоплазмі шляхом скручування та згортання поліпептидного ланцюга[19].

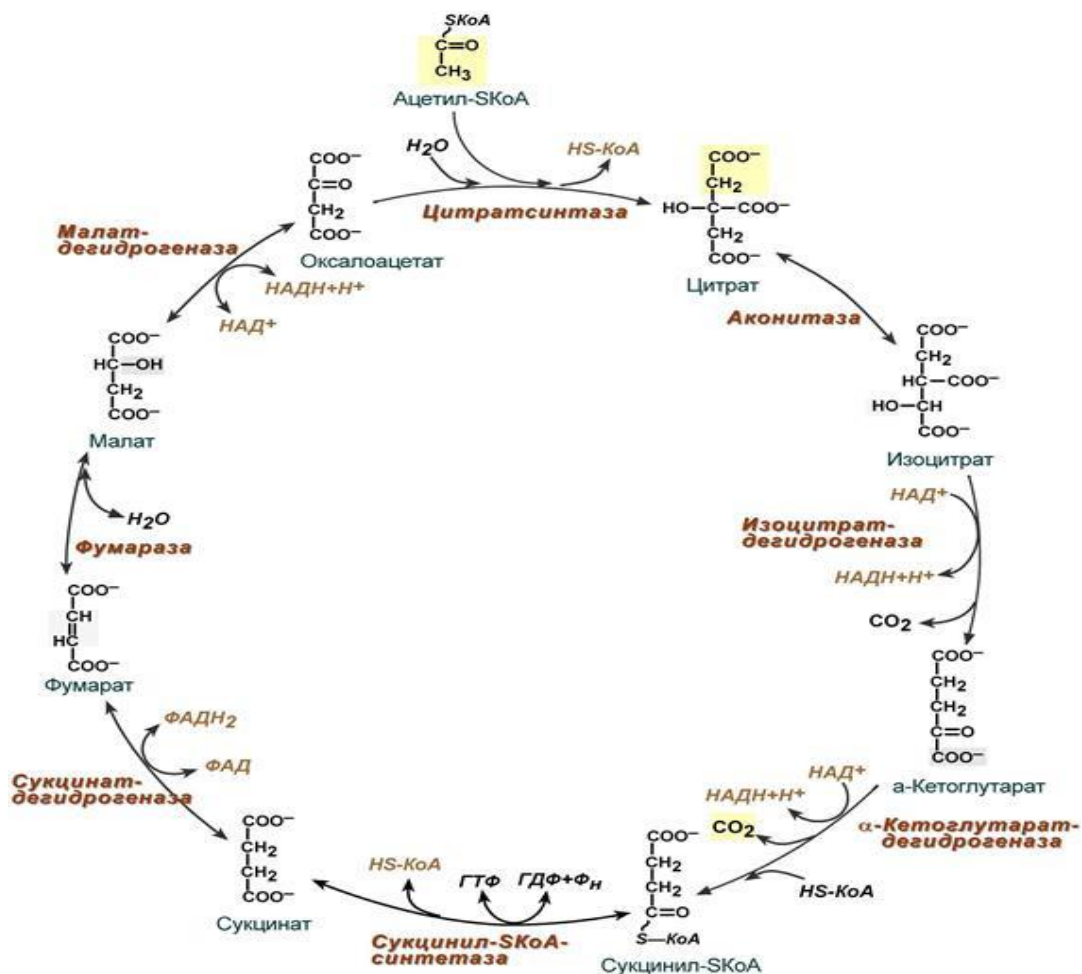


Рис 2.3 Схема метаболізму пірувату *B.thuringiensis* за ЦТК[20].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отримано в результаті реалізації технології

Склад препарату: спори культури *B.thuringiensis*, та продукти її метаболізму(β - і δ - токсини), інертні наповнювачі - сульфанол, карбокси-метилцелюлоза та каолін, які забезпечують збереження, змочування та стабільність. Титр, не менше: 1×10^9 КУО/мл.[21]

Ентомопатогенні препарати на основі *B.thuringiensis* представлені великою кількістю штамів і кожен з них синтезує токсин, специфічний по відношенню до класів комах: *Lepidoptera* і *Diptera* . Розрізняють наступні види токсинів.

1) α -екзотоксин (фосфоліпаза С) – це продукт клітин бактерій, що ростуть. Токсична дія ферменту пов'язана із індукуванням розпаду незамінних фосфоліпідів в тканинах комах, що призводить до їх загибелі [15];

2) β -екзотоксин (термостабільний екзотоксин) містить в складі аденін, рибозу і фосфор у відношенні 1:1:1. Молекула екзотоксину складається із нуклеотиду, зв'язаного через рибозу та глюкозу з алослизовою кислотою. Дія екзотоксину зумовлена інгібуванням нуклеотидази і ДНК-залежної-РНК-полімерази, які пов'язані з АТФ, що призводить до припинення синтезу РНК. Токсин володіє доволі широким спектром дії на комах та являється мутагеном, вражаючим генетичний апарат. Останнім часом усе більше держав відмовляються від застосування препаратів, що містять β -екзотоксини, так як його визнали небезпечним для людини та тварин ;

3) γ -екзотоксин – недостатньо вивчений і не доведена його токсичність;

4) δ -ендотоксин (параспоральний кристалічний ендотоксин). Утворюється в процесі споруляції у протилежній до спори, яка формується, частині клітини бактерії. На завершальній стадії спороутворення токсин стає форми правильного восьмикутного кристалу, розміри варіюють від $0,5 \times 1,3$ до $1 \times 3,5$ мкм [3, 7]. У більшості різновидів *B.thuringiensis* утворення спори та кристалу супроводжується розпадом клітинної стінки, у результаті чого

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

спори та кристали вивільняються і потрапляють у культуральне середовище. Для розчинення кристалів необхідне лужне середовище (рН=10-12), яке властиве кишечнику комах. Білок кристалів δ -ендотоксину є протоксином, що розщеплюється в лужному середовищі кишечника комах під дією протеолітичних ферментів, таким чином утворюючи активізований токсин, що призводить до паралічу або загибелі комах [22].

Ентомопатогенні препарати, які зараз випускаються на основі *B. thuringiensis*, являють собою суміш спор і кристалів δ -ендотоксину. Хоча відомо, що основним діючим субстратом є білковий інсектицидний δ -ендотоксин та наявність спор є не обов'язковою. Титр життєздатних спор в препаратах досягає 60-100 млрд./г. При застосуванні даних препаратів білкові кристали розкладаються та через деякий час зникають, тоді як спори через свою стійкість продовжують тривалий час існувати та в сприятливих умовах можуть проростати та розмножуватися. У зв'язку із цим доволі перспективним є створення безспорових біоінсектицидів, що ще більш екологічно безпечні, ніж існуючі засоби захисту рослин [23].

2.4 Методи очистки цільового продукту

Після стадії виробничого культивування культуральна рідина піддається стабілізації шляхом внесення в неї інертних наповнювачів для кращого збереження та стійкості препарату. За необхідності в культуральну рідину додають їдкий натрій для стабілізації величини рН на рівні 6,8-7,2. У переважній більшості препарати на основі *B. thuringiensis* випускають у вигляді сухих порошоків чи волигих паст з концентрацією клітин понад 20 млрд КУО/г. Дана форма препарату зберігається довше і продається у мішках масою від 1 кг. Недоліком такої форми препарату є її ціна, так як при виробництві використовуються матеріало- і енергомісткі процеси сепарування і сушіння. А при виробництві препарату у вигляді рідкої стабілізованої суспензії не потрібно великих витрат при виробничому циклі і собівартість виробництва набагато менша. В якості наповнювачів

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

використовують різноманітні компоненти , проте для даного препарату було обрано комплекс із трьох наповнювачів , що задовольняють найкраще зреження і стабілізацію культуральної рідини: карсиметилцелюлоза, каолін і сульфанол. Наповнювачі виконують роль «основи» для сорбції на своїй поверхні екзотоксинів , що продукуються *B.thuringiensis* , а також забезпечують ефективне змочування рослин при оприскуванні рослин та захист екзотоксинів від прямих сонячних променів[25]. Підприємства , що випускають такий вид продукції , в основному спрямовані на внутрішній ринок свого району чи області , і не зацікавлені у транспортуванні препарату. Також значний плюсом даного препарату є те що він має широкий спектр дії і може використовуватися як і с/г , так і для саду чи лісу. Ентомопатогенний препарат розливається у пластикові бутілі об'ємом 1л , даний об'єм зумовлений тим , що приготування робочого розчину надзвичайно спрощується і легко розрахувати культисть препарату на необхідну площу. Розрахунок проводиться у відношенні 1л препарату на 1000-1300 м². Також препарат стандартизовано до титру не менше 1 млрд КУО/мл, що дозволяє його використовувати для стандартної розпилювальної апаратури.

2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Основними діючими компонентами препарату є δ -ендотоксин , що діє позпоседньо на шкідників , та спори , що потрапляючи у ґрунт проростають і стають додатковим ентопатогенним фактором, що діє уже на наступні покоління комах. Розглянемо детально механізм дії δ -ендотоксину на біохімічні процеси комах.

Для того, щоб комаха загинула, кристали мають потрапити в її організм. При певних індивідуальних відмінностях у комах первинним місцем дії δ -ендотоксину завжди є середній відділ кишківника [26].

У параспоральному кристалі біоінсектицид зазвичай знаходиться у неактивній формі; при солюбілізації кристалу білок звільняється у формі

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

протоксину, тобто попередника активного токсину. Протоксин класу токсинів CryI має мол. масу приблизно 130 кДа. Після проковтування шкідником параспорального кристалу, протоксин активується в кишечнику в умовах лужного рН (7,5-8,0) та під дією протеолітичних трипсино- та хемотрипсиноподібних ферментів перетворюється у активний токсин із молекулярною масою приблизно 68 кДа [27].

На наступній стадії токсичного впливу зв'язування активного токсину із афінним до нього білком-рецептором, експонованих на всій поверхні апікальних мембран епітеліальних клітин кишечника. Зв'язування ендотоксину з рецептором є оборотним процесом .

Далі відбувається необхідна перебудова конформації молекули токсину із наступним впровадженням його деяких формуючих і структур у мембранний бішар. Після цього зв'язування токсину із мембраною стає незворотнім. Необхідність вбудовування α -спіралей першого домену токсину у мембрану чутливої клітини для того, щоб зв'язування стало незворотнім, пояснюється тим, що неповноцінна молекула токсину, що складається тільки з II-го і III-го доменів, зв'язується із мембраною тільки оборотно [28].

Одночасно із вбудовуванням в мембрану відбувається об'єднання кількох молекул токсину. Ансамбль трансмембранних ділянок, які належать кільком асоційованим молекулам токсину, утворює пору чи іонний канал. В першому випадку (утворення пори), відбувається загибель клітин за механізмом колоїдно-осмотичного лізису. В другому, (утворення іонного каналу) – внаслідок різкої зміни йонного складу та рН внутрішньоклітинного середовища. Приблизно через 15 хвилин після формування іонного каналу клітинний метаболізм блокується, комаха перестає харчуватися, а далі відбувається зневоднення організму та в кінці кінців настає смерть [29].

Оскільки перетворення протоксину в активний токсин відбувається тільки в умовах лужного рН і в присутності певних протеїназ, ймовірність шкідливого впливу токсинів на людину і сільськогосподарських тварин мала .

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

B. thuringiensis був вперше виявлений в 1901 р. японським вченим, який досліджував зменшення популяцій шовкопрядів, які він відносив до паличкоподібної грампозитивної бактерії. У 1911 р. його було повторно відкрито німецьким вченим, розчин кристалізованих токсинів *B. thuringiensis* виявився високоефективним проти деяких шкідників сільськогосподарських культур, включаючи кукурудзяного жировиката кукурудзяного черв'яка. У США продукт був вперше комерційно використаний як інсектицидний спрей у 1958 р., а нині різні штами бактерії використовуються для боротьби з низкою шкідників сільськогосподарських комах та їх личинок. Токсин, що продукується може бути застосований до сільськогосподарських культур, включаючи картоплю, кукурудзу та бавовну, як спрей або, рідше як зерниста форма[30].

Починаючи з 1995 року, коли американське агентство з охорони навколишнього природного середовища (ЕРА) вперше схвалило використання технології введення генів, що продукують токсини у рослини, у багатьох країнах комерційне виробництво кукурудзи, бавовни, картоплі та рису різко зросло, хоча насадження часто коливаються залежно від рівня зараженості шкідниками. З того часу почалось інтенсивне вивчення геному *B.thuringiensis*, в результаті чого тепер відомо, що геном *B.thuringiensis* представлений кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК, що містить 4883 гена, з яких 4736 кодують білки. Також в геномі присутня плазміда рALH1, яка представлена кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК, що містить 62 гена, з яких 62 кодують білки[31].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Поворозний І.В.				Д	27	96
Консульт.								
Керівник		Тодосіючук Т.С.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

3.1.1 Типовим представником групи є *Bacillus subtilis* — важливий модельний організм. Так як *B. subtilis* є надзвичайно важливим у генетичному конструюванні нових продуцентів його геном є досконально вивченим. Детальна генетична карта *B. subtilis* представлена у Додатку А.

B. subtilis надзвичайно придатний до генетичних маніпуляцій, через що став популярним модельним організмом для багатьох лабораторних досліджень, зокрема досліджень споруляції, яка є прикладом диференціації клітин. Через популярність, як лабораторного модельного організму, *B. subtilis* досить часто називають грам-позитивним еквівалентом *E. coli*, найбільш дослідженої грам-негативної бактерії [32].

B. subtilis є надзвичайно важливим продуцентом протеаз, амілаз і ще ряду ферментів, амінокислот і деяких полісахаридів. Зокрема, протеаза (субтілізин) використовується в якості компонента миючих засобів та для видалення волосся на підприємствах з виробництва шкіри. Також він є важливим продуцентом пептидних антибіотиків. Іще зважаючи на наявність антагоністичних властивостей проти фітопатогенів, використовується в біозахисті рослин. Штам грам-позитивної спороутворюючої аеробної ґрунтової бактерії *B. Subtilis*, що депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, за складом біологічно активних речовин здатний до створення на його базі лікувально-профілактичних препаратів для потреб медицини та ветеринарії.

3.1.2 Інсектицидні токсини (*Cry*-токсини) *B. thuringiensis*, які часто називаються δ -ендотоксинами є характерними для певних комах. Сімейство генів, що кодують ці токсини, - це сім'я генів *Cry*. Загальна характеристика генів *Cry* полягає в тому, що вони експресуються під час нерухомої фази росту. Клітинні білки, кінцеві продукти експресії гена *Cry*, становлять 20–30% від сухий маси клітини і, як правило, накопичуються в материнській клітині, починаючи з III стадії спороношення і продовжуючи до VII стадії [33].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

Термін δ -ендотоксин, відносно Cry-токсину, є неправильним так як параспоральний кристалічний білок *B.thuringiensis* як такий тому, що він утворюється всередині клітини і тому, що він є четвертим у порядку інших токсичних компонентів, виявлених у бактерії. Однак ендотоксини асоціюються з ліпополісахаридним фрагментом повного соматичного антигенного комплексу "О", що знаходиться у зовнішній мембрані різних грамнегативних бактерій і є важливим фактором їх здатності викликати захворювання. За способом дії, токсин Cry - це "простий" токсин, який визначається як мономер або олігомер токсичного простого білка. Cry - токсин існує як токсичний мономер та здатний до олігомеризації.

Високий рівень синтезу Cry-білка зазвичай контролюється різноманітними механізмами, що виникають на рівні транскрипції, посттранскрипції та посттрансляції. Як правило, ініціювання споруляційного процесу в *B.thuringiensis* контролюється послідовною активацією сигма-факторів, які пов'язують ядерну РНК-полімеразу з прямою транскрипцією, використовуючи специфічні для споруляції промотори. σ_K , які жорстко регулюються і з'являються у фіксованому порядку під час споруляції[34].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму

Цілеспрямовані дослідження біологічного потенціалу природних ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* (як продуцентів біологічно активних речовин та агентів біопрепаратів) з комплексом властивостей, корисних для агрофітоценозів, мають надзвичайно важливу роль і актуальність у забезпеченні екологічно збалансованого аграрного виробництва. У сучасних умовах скринінг нових штамів *B. thuringiensis*, ефективних проти широкого спектру комах (*Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), комплексне вивчення особливостей взаємовідносин «патоген-хазяїн» та

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

створення біопрепаратів групи Bt для фітозахисту є надзвичайно актуальними напрямками[35].

Сьогодні в селекції мікроорганізмів існують три основні напрямки:

1. Підвищення стійкості до фагів, антибіотиків та зниження вимог до складу поживного середовища.
2. Підвищення кількості нагромадження потенційно корисних речовин.
3. Підвищення вимог до якості ростових речовин.

У селекції багатьох бактерій широко застосовуються штучний мутагенез, а також використовуються плазмідні, схрещування штамів за допомогою вірусів-бактеріофагів, генна й клітинна інженерія. Методи генетичної селекції мікроорганізмів постійно вдосконалюються.

Прокаріоти мають для селекції ряд важливих переваг: вони швидко розмножуються, у багатьох з них невідомий(або відсутній) статевий процес, тому метод гібридизації не застосовується. Кільцева молекула ДНК дає можливість проявлятися мутаціям вже в першому поколінні нащадків.

3.2.1 У селекції промислових штамів *B.thuringiensis* застосовують штучний добір із застосуванням фізичних та хімічних мутагенів. Такий добір дає можливість отримати штами із покращеними властивостями : більша стійкість до несприятливих факторів та підвищений рівень синтезу цільового продукту. Але такий метод застосовується рідко , через свою складність проведення та не високу ефективність.

3.2.2 Індукований мутагенез застосовують для підвищення генетичного різноманіття в популяції виду. Біологічна основа мутагенезу - це внесення помилок в матричний процес реплікації ДНК, в результаті якого ДНК-послідовності змінюються по відношенню до батьківських послідовностей, і в разі нелетальних мутацій можуть привести до зміни фенотипу мікроорганізмів[36].

Залежно від природи факторів, мутагенез ділиться на хімічний та фізичний. Як хімічних мутагенів частіше використовуються такі речовини

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

Всі вони є алкілюючими агентами, і додають метильну або етильну групи до азотистих основ в ДНК. В результаті додавання метильної групи виникають мутації за типом транзиції: пара GC заміщається на пару AT.

Як фізичні мутагенів застосовують ультрафіолетове опромінення або гамма-опромінювання. Ультрафіолетове опромінення виробляють кварцовими лампами. Гамма-промені виробляють за допомогою гамма-джерел (радіоактивних металів) в спеціальних камерах, які захищають від випромінювання радіації в навколишнє середовище.

Мутагенезу за допомогою гамма-випромінювання піддають водні суспензії спор *B.thuringiensis*. У селекції використовуються дози мутагену, що забезпечують виживання від 0.1 до 80%.

Біологічний матеріал, що піддається дії фізичного мутагена повинен бути максимально дискретним і містити мінімальну кількість ядер в кожній пропагулі, щоб уникнути подальшої генетичної різноманітності ядер. Кількість грудок (конгломератів) в суспензії повинно бути мінімальним, так як мутація в одній з клітин конгломерату при її проростанні може бути втрачена.

Конгломерати в суспензії розбивають за допомогою мікробіологічної качалки, і потім суспензію фільтрують через стерильний фільтр.

Після опромінення колонії, що проросли досліджують на присутність аспорогенних мутантів, та здійснюють їх пересів на ПС, що не містить летких речовин. Після чого відбувається їх витримання в термостаті при 90°C протягом 1 год. Далі відбувається інкубування отриманих мутантів до отримання аспорогенних колоній та дослідження їх на рівень синтезу дельта-токсину, як основного діючого компонента ентомопатогенного препарату. Якщо збільшення рівня синтезу є задовільним, то відбувається стабілізація культури та відбір мутантів із стабільним рівнем синтезу з подальшою перевіркою закріплення мутації у часі. В результаті отримуємо новий штам із покращеним рівнем синтезу дельта-токсину, що може бути застосованим для промислового виробництва[37].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

3.2.3 Також використання методів гібридизації для отримання промислових штамів *B.thuringiensis* є досить ефективним.

Використовуваний методи дозволяє створювати нові комбінації генетичного матеріалу, клонувати корисні гени кристалогенних білків різного типу і отримувати препарати, що володіють видоспецифічною ентомоцидною дією [11]. Для об'єднання в одному геномі детермінантів β -екзотоксину і ентомоцидного білка Cry III-типу було запропоновано конструювання транслокованих елементів з генами штамів-продуцентів ентомоцидних з'єднань - β -екзотоксину і дельта-ендотоксину. В результаті новий препарат мав комбіновану дію, і це значно розширило потенційні можливості біологічного контролю чисельності ряду шкідників сільського господарства. Так, біологічна активність нового штаму зростал у 3-4 рази по відношенню до личинок колорадського жука в порівнянні з вихідними продуцентами, і при цьому знизилася ймовірність формування резистентних популяцій комах.

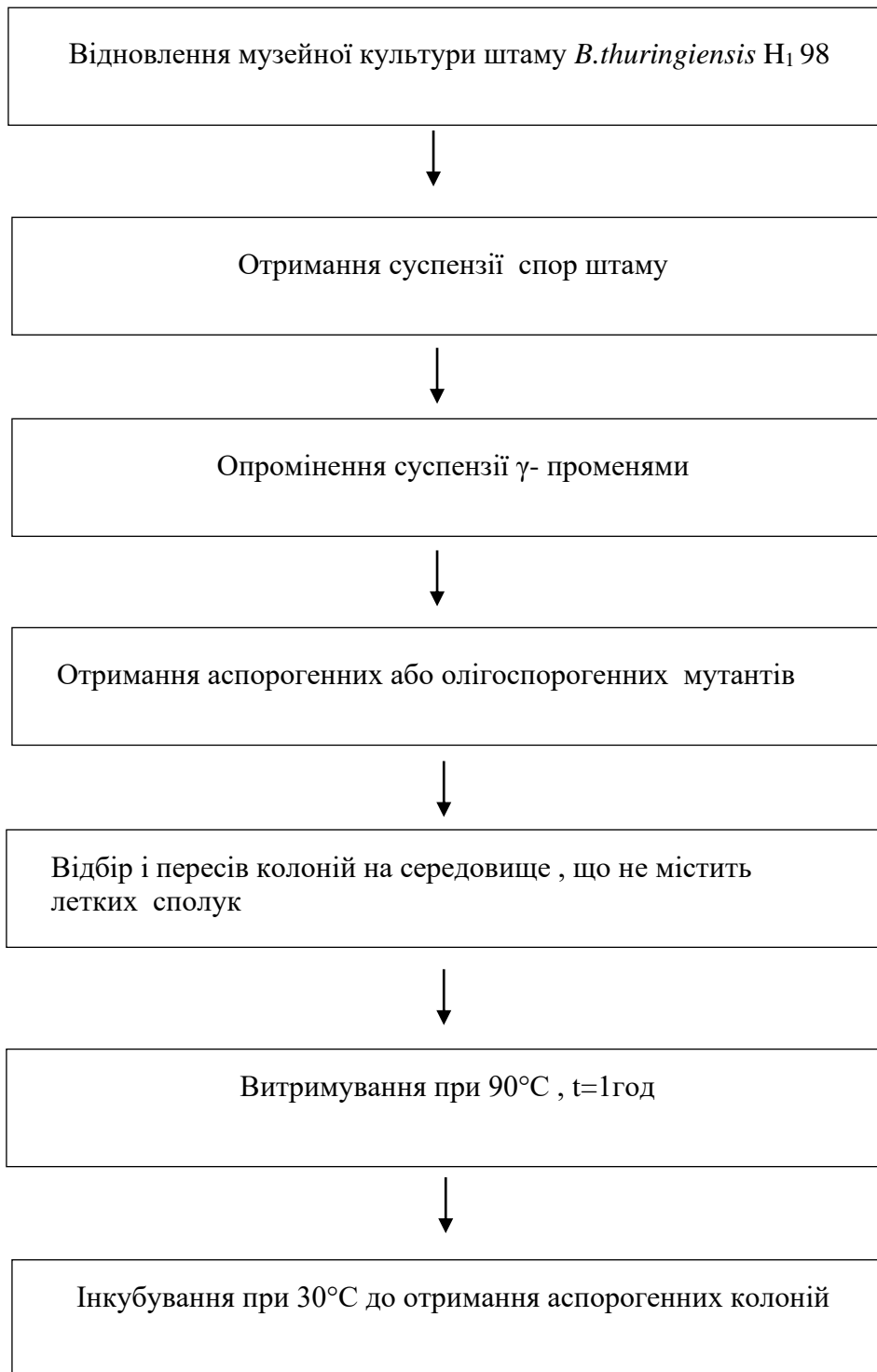
3.2.4 У селекції промислових штамів *B.thuringiensis* також доволі часто застосовують методи генної та клітинної інженерії. Різноманітність штамів *B.thuringiensis* обумовлена можливістю перенесення їх генів як шляхом трансдукції заражених фагів , так і в результаті кон'югації . Висока ефективність передачі ряду кон'югативних плазмід *B.thuringiensis* продемонстровано не тільки при спільному культивуванні штамів цієї бактерії на твердих або рідких середовищах в лабораторних умовах, але і в ґрунті і личинках комах .

Штами *B.thuringiensis* можуть обмінюватися генетичним матеріалом і з іншими бактеріями як близькородинними (*B. cereus*, *B. anthracis*), так і генетично більш віддаленими (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*) . Генетична пластичність *B.thuringiensis* пов'язана також з наявністю в її геномі різноманітних транслокованих генетичних елементів - транспозонів і IS-елементів. Слід зазначити, що в переважній більшості випадків

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

детермінанти кристалічного білка є плазмідними генами і можуть також входити до складу транспозонів .[38]

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі



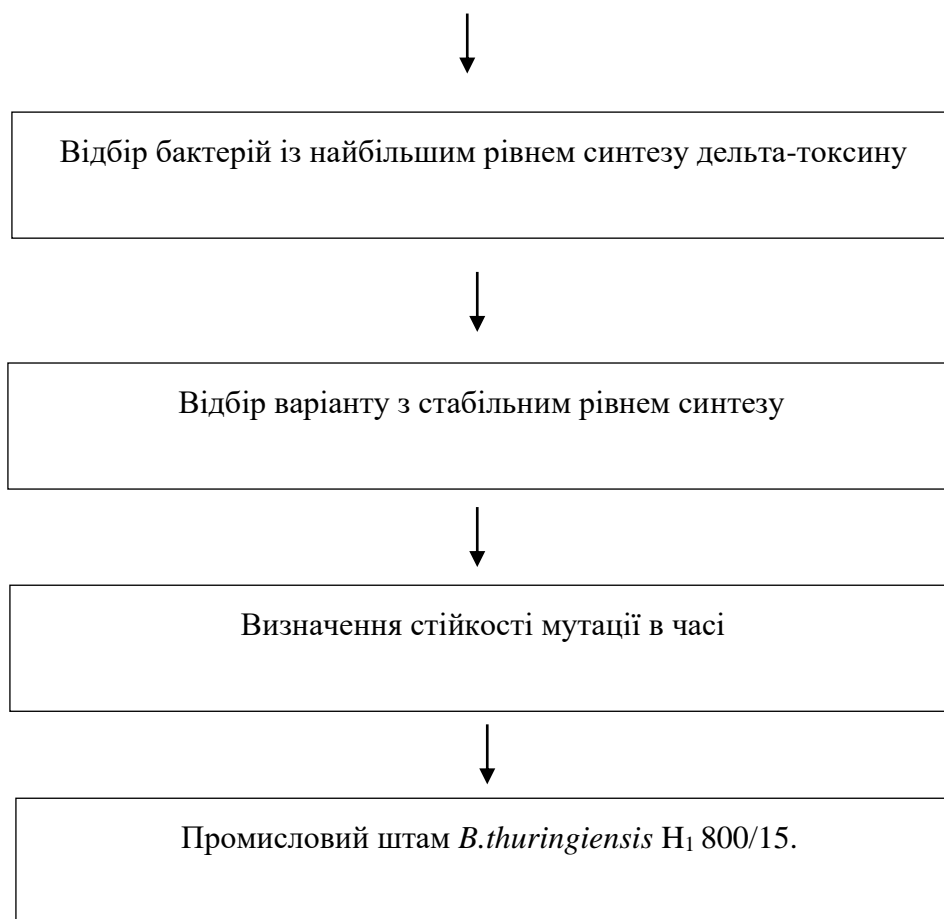


Рис.3.3 Схема отримання промислового штаму *B.thuringiensis* H₁800/15[39].

3.4.Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента.

Обраний продуцент для виробництва ентомопатогенного препарату є факультативним аеробом, то технологічний процес має певні особливості. Зважаючи на те, що організм- продуцент потребує інтенсивної аерації, тому у виробничому ферментері об'ємом 1 м³ потрібно встановити барботер для подачі повітря у рідке поживне середовище, а для кращого розчинення і гомогенізації виникає необхідність у механічному перемішуючому пристрої. Для цього необхідна швидкість обертання мішалки має становити 215-220 об/хв. Зважаючи на в'язкість середовища та необхідну швидкість перемішування було обрано шестилопатеvu турбінну мішалку, що

забезпечує відповідний режим перемішування та є доволі простою в обслуговуванні[40].

Також при реалізації технологічного процесу виникають деякі труднощі у його ефективному перебігу, насамперед це пов'язано із активним піноутворенням при виробничому біосинтезі, так як до складу поживного середовища входять кормові дріжджі, що сприяють піноутворенню, тому обов'язком є додавання піногасника для усунення цієї проблеми. У якості піногасника використовується суміш різноманітних інертних речовин, що не впливають на процеси біосинтезу цільового продукту. Необхідною умовою ефективного і продуктивного культивування є відповідна аерація поживного середовища, яка в залежності від стадії розвитку культури повинна змінюватись. Враховуючи невеликий об'єм ферментера та присутність перемішуючого пристрою найбільш доцільним буде використання барботеру, що знаходяться безпосередньо під мішалкою у формі тороїда.

Отже, враховуючи всі особливості конструкції ферментера при виробничому культивуванні він повинен бути оснащеним: турбінною шестилопатевою мішалкою відкритого типу, барботером та системою піногасіння.

					ДП.БТ6212.00.0000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції

Назва продукції: біологічний інсекто-акарицид широкого спектру дії проти шкідників с/г культур. Аналогічний препарат випускається під ТМ «Ензим-Агро» - «Колорадоцид», що має схожий спектр дії.

На дану продукцію діє :ТУ У 24.2-32813696-018:2010 , а також Органік стандарт з виробництва допоміжних речовин, що можуть використовуватись в органічному с/г та переробці(з врахуванням вимог Стандарту, що еквівалентний Постановам ЄС 834/2007 та 889/2008)[24].

Призначення продукції та можливі галузі застосування: мікробіологічний препарат, що застосовується для захисту сільськогосподарських, плодово-ягідних і лікарських культур від личинок шкідників.

Препаративна форма препарату: рідина, що являє собою спори культури *B. thuringiensis* , та продукти її метаболізму; інертні наповнювачі на основі каоліну , карбоксиметилцелюлози та сульфанолю , що забезпечують збереження, змочування і стабільність. Титр клітин: $1 \cdot 10^9$ КУО/мл.

Кінцевий продукт упаковано в пластикові бутілі місткістю 1л , що забезпечує зручне приготування робочого розчину для обробки с/г культур від різномітних шкідників.

Транспортування: препарат транспортують в закритих транспортних засобах всіма видами критого транспорту при температурі повітря 4—18 °С відповідно до ГОСТ 7768-90.

Умови зберігання: температура зберігання +4°C до +12°C;зберігати в сухому місці захищеному від прямих сонячних променів.

Термін придатності: 12 місяців[21]

					ПБ.БТ6212.00.000 ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Паворозний І.В.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНИЙ РОЗРАХУНОК	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	36	96
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

Готова форма кінцевого продукту – суспензія спор *B.thuringiensis* та продуктів її метаболізму, що стабілізована наповнючами для збереження, змочування та стабільності. Готовий препарат розливають у бутили об'ємом 1л. Даний об'єм тари є найбільш доцільним, так як готовий препарат являє собою концентрат спор та продуктів метаболізму з титром не менше 1 млрд КУО/мл. Для використання у вигляді водної суспензії готують робочий розчин, що безпосередньо використовується для розпилювальної апаратури. Норми витрати препарату залежать від шкідника, на якого відбувається вплив, але в середньому це до 10л робочого розчину на 1 га.

Препаратом аналогом з подібною дією був обраний препарат ТМ «Ензим-Агро» «Колорадоцид», що володіє наступними властивостями:

Біологічний інсекто-акарицид з широким спектром дії. «Колорадоцид» володіє бінарною дією, тобто безпосередня дія дельта-токсинів на організм шкідників, та дія спор уже на наступні покоління личинок комах. Дельта-ендотоксин активується в кишечнику шкідників і викликає його дисфункцію. Бета-екзотоксин пригнічує синтез РНК в клітинах комах. У результаті дії препарату на комах, в тому числі й в сублетальних дозах, відбувається порушення метаморфозу, а також інгібуються процеси травлення, знижується плодючість самиць й життєздатність наступних поколінь. Масова загибель шкідників відбувається на 2-5-ту добу після обробки рослин препаратом.[24]

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика усієї сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у технологічному процесі наведена у таблиці 4.1 із вказанням відповідних НТД на перевірку їх якості

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1.Основна сировина:			
1.1 Дріжджі кормові	ДСТУ 8723:2017	Вологість не більше 11%	Компонент поживного середовища
1.2 Кукурудзяне борошно	ГОСТ 14176-69	Вологість не більше 15% і зольність не більше 1,3%	Компонент поживного середовища
1.3 Амоній сульфат	ДСТУ ISO 3332:2008	Масова частка азоту не менше 21%	Компонент поживного середовища
1.4 Вода питна	ДСТУ 7525:2014	До 100 МО/мл Усі показники згідно ДФУ	Холодо- і теплоагент; для мийки і ополіскування обладнання, приготування поживних середовищ
1.5 Калій фосфат	ГОСТ 4198-75	Масова частка калій фосфату не менше 99%	Компонент поживного середовища
1.6 Натрій хлорид	ГОСТ 4233-77	Масова частка хлориду натрію не менше 99%	Компонент поживного середовища
1.7 Магній сульфат	ГОСТ 450-77	Масова частка у ПС 1 г/л	Компонент поживного середовища

Продовження таблиці 4.1

1.8 Крейда	ДСТУ Б А.1.1-20-94	-	Компонент поживного середовища
1.9 Кальцій хлорид	ГОСТ 450-77	Масова частка кальцій хлориду не менше 80%	Компонент поживного середовища
1.10 Діамоній фосфат	ГОСТ 8515-75	Масова доля оксиду фосфору не менше 52%	Компонент поживного середовища
2. Допоміжна сировина:			
2.1 Натрій їдкий технічний	ГОСТ 2263-79	Масова частка гідроксиду натрію не менше 42%	Для регулювання кислотності, нейтралізації стічних вод
2.2 Засіб дезінфекційний Дезактин	ТУ У 22920528.002.	Вміст активного хлору не менше 14%	Для санітарної обробки приміщень
2.3 Засіб дезінфекційний Біомой	ТУ У 22902465.005-96	Діюча речовина – сульфанолю – 5-8%	Для санітарної обробки обладнання
2.4 МПА	«Ензим -агро»	-	Мікробіологічний контроль
3. Матеріали:			
3.1 Пластикові тару	ДСТУ 2890-9	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	
3.2 Пластикові пробки	ГОСТ 32626-2014	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	
3.3 Поліетилен пакувальний	ГОСТ 25951-83	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	
3.4 Папір клейкий ярликовий	Xerox, Apli, Raflatas	-	Маркування готової продукції
3.5 Тканина шовкова	ГОСТ 4403-91	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Фільтруючий і стерилізуючий матеріал

Продовження таблиці 4.1

3.6 Фільтрувальний папір	ГОСТ 12026-76	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Фільтруючий і стерилізуючий матеріал
4. Напівпродукти:			
4.1 Посівний матеріал	Згідно виробничого регламенту	Мікробіологічна чистота	Для засіву біореактора

4.3. Опис технологічного процесу

Технологія виробництва ентомопатогеного препарату складається із наступних принципових стадій біотехнологічного виробництва, а саме: підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування та стабілізація готового продукту. Ці процеси докладніше представлені розгорнуто у графічній частині дипломної роботи на технологічній схемі виробництва ентомопатогеного препарату. Апаратурне оформлення процесів розгорнуто показано на графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва біоінсектициду.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Відповідно до ГОСТ 52550-2006.

Санітарна підготовка виробництва - це блок робіт та операцій, які забезпечують регламентовану якість препарату на всіх наступних стадіях виробництва. Даний етап включає в себе підготовку персоналу і приготування миючих та дезинфікуючих розчинів.

Санітарна підготовка виробництва і технологічний процес проводяться відповідно до вимог GMP, ДСанПіН і чинних нормативних актів в галузі біотехнологічної промисловості

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Особи, що допускаються до виробництва повинні мати відповідну професійну підготовку та пройти інструктаж з охорони праці, ознайомитись з

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

інструкцією з техніки безпеки на роботу, що буде виконуватися, а також інструктаж по санітарним основам.

Медичне обстеження персоналу проводиться 1 раз на рік. Безпосередньо на виробництві з персоналом проводять інструктаж, щодо дотримання правил гігієни та санітарно – гігієнічних вимог[44].

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Персонал та обладнання зобов'язані пройти відповідну обробку дезінфікуючими розчинами, відповідно до вимог GMP, з метою зменшення ризику зараження цільового продукту (отримання бракованої продукції).

Дезінфікуючі розчини, що призначені для обробки приладів та приміщень, готують згідно з «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001р. № 502.

ДР 1.2.1. Приготування розчину Дезактину.

Мийно-дезінфекційний засіб Дезактин використовують для очистки та дезінфекції поверхонь всіх типів, для передстерилізаційної очистки. Володіє миючими властивостями. Також характерна бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна дія. Розчин Дезактину готується 0,2 % концентрації, для цього 2 г порошку дезактину розбавляють 1 літром води.

ДР 1.2.2. Приготування розчину Біомою.

Багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Застосування Біомою: миття і дезінфекція різноманітного технологічного обладнання, інвентарю, комунікацій і тари (особливо відмінно мис склотару). Для миття використовують 0,5 % розчин Біомою. Приготування: 5 г концентрату Біомою розбавляють 1 літром води

ДР 2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 2.1 Щоденне прибирання

На усіх виробничих ділянках 1 раз за зміну проводять вологе прибирання приміщень, обладнання і трубопроводів, так як можливий

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

розвиток міцеліальних грибів і дріжджів. Робочий персонал зобов'язаний вдягнути гумові рукавиці та взуття, з метою уникнення пошкоджень одягу та шкіри дезінфікуючими розчинами.

Панелі, стіни, двері виробничих приміщень класу D щоденно протирають вологими серветками, змоченими у 0,2% мийно-дезінфекційному засобі Дезактину. Розчини після відпрацювання направляються на стадію знешкодження рідких відходів.

Для знезараження поверхні стін, підлоги, стелі й обладнання, а також повітря виробничих приміщень використовують бактерицидні лампи. Після проведення щоденної дезінфікуючої обробки приміщення звільняють від персоналу й вмикають бактерицидні лампи, які розташовані на стелі не менше, ніж на 2 години.

ДР 2.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання приміщення проводять один раз на 5-6 днів або на вимогу бактеріолога .

Стіни, двері, стелю, підлогу та інші поверхні приміщення класу чистоти D зрошують 0,2 % мийно-дезінфекційним засобом Дезактину з розрахунку 150-200 мл/м² поверхні, потім приміщення закривають на 30-40 хв., після чого надлишок розчину видаляють за допомогою губки. Відпрацьовані мийні розчини направляються на знешкодження рідких відходів .

По завершенню обробки приміщення звільняють від персоналу і вмикають бактерицидні лампи на 10-12 годин, і не менше, як за 30 хв. до початку роботи вмикають вентиляцію для ламінарного потоку повітря.

ДР 3. Підготовка обладнання та комунікацій

До та після технологічного процесу здійснюють підготовку обладнання і комунікацій. Даний блок робіт включає мийку, обробку дезінфікуючими розчинами обладнання і комунікацій із подальшим ополіскуванням. Велике значення також має перевірка на герметичність та справність, а також стерилізація обладнання, коли це дозволяє технологічний процес. Підготовка

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

обладнання регламентується відповідними розділами технологічних інструкцій і інструкцій із експлуатації обладнання за встановленими на підприємстві відповідними методиками.

ДР 3.1. Мийка та дезінфекція вузлів обладнання.

Обробку обладнання і комунікацій здійснюють 0,5% розчином Біомою та дистильованою водою. Для миття обладнання використовується безрозбірна СІР мийка. Відпрацьований миючий розчин направляється на знешкодження. Обладнання та комунікації, після миття, ополіскують упродовж 10 хв. холодною водою. Стічні води зливаються і направляються на стадію знешкодження відходів.

ДР 3.2. Технічний огляд та перевірка на герметичність.

Апарат з прилеглими трубопроводами перед завантаженням середовища перевіряють на герметичність під дією атмосферного тиску (0,15 - 0,19) МПа. Нещільності в фланцевих з'єднаннях, зварювальних швах знаходять за допомогою мильної води. Остаточну перевірку герметичності апарату з прилеглими ділянками трубопроводів здійснюють за допомогою галоїдних течієшукачів під атмосферним тиском (0,15-0,19) МПа і при температурі (78-81) °С. При наближення щупа течієшукача до наявних нещільностей апарата - пристрій буде подавати сигнал. Тривалість перевірки цим методом одного апарату становить 1,5-2 години. Знайдені пропуски усувають й проводять повторну перевірку.

ДР 3.3. Стерилізація обладнання.

Стерилізацію обладнання ведуть насиченою водяною парою за температури (140 ± 2)°С і тиску (0,2 ± 0,02) МПа. На даній стадії контролюється температура, тиск водяної пари, час стерилізації та відсутність сторонньої мікрофлори. Разом весь процес стерилізації одного ферментера становить 1 година.

ДР 4. Підготовка повітря.

ДР 4.1. Підготовка вентиляційного повітря.

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

Повітря для виробничих приміщень є потенційним джерелом забруднень, тому його очищення є одним з ключових питань технологічної гігієни. Вирішення проблеми досягається з використанням фільтрів відповідної ефективності. Згідно із GMP, визнаним підходом, що застосовується є багатостадійна фільтрація повітря.

При подачі повітря у приміщення необхідно забезпечити виконання цих чотирьох основних операцій:

- стиснення повітря для подолання значного опору повітроводів та арматури;
- видалення пилу й інших частинок;
- видалення і знищення залишкових мікроорганізмів;
- регулювання температури і вологості.

ДР4.1.1. Забір повітря

Забір повітря з атмосфери виконується за допомогою повітрозбірника через трубчасту конструкцій висотою 8-10 м. Труби розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю.

Температура і вологість повітря із зовні, а також кількість в ньому пилу та мікроорганізмів непостійна і залежить від пори року, погодних умов, географічного розташування підприємства й висоти забору повітря.

ДР 4.1.2. Механічна очистка повітря

Механічна очистка повітря від контамінантів має за мету видалення аерозольних механічних часток та попереджає абразивне пошкодження компресійної апаратури. Тому для виконання цієї операції використовують фільтри попередньої очистки. Дані фільтри встановлюються на всмоктуючий лінії перед компресором чи вентилятором. Вони дозволяють видалити частинки розміром до 5 мкм. Таке очищення забезпечує видалення пилу, крапель води і частково мікроорганізмів. Як правило, коефіцієнт проскоку від загального вмісту твердої фази (пилу) складає приблизно 10%.

Найчастіше обирають фільтри сухих або масляних типів, періодичної або безперервної дії.

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

Механічні домішки видаляються під час проходження повітря крізь фільтр попередньої очистки повітря з діаметром пор фільтрувального матеріалу приблизно 5-10 мкм.

ДР 4.1.3. Нагнітання повітря

Нагнітання повітря відбувається під час пропускання повітря крізь вентилятор під тиском 0,2 МПа.

ДР 4.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря

Через вентилятор повітря надходить до нагрівальної колонки, де потім відбувається усереднення і стабілізація фізико-хімічних показників повітря температура не більше 20°C й вологості 40-60%. На вході гострої пари у нагрівальну колонку і в місці зливу із неї конденсату розташовані спеціальні вентиля. Завершується даний процес у повітряному фільтрі з діаметром пор фільтрувального матеріалу 1,5 мкм, де відбувається очистка повітря від дрібних частинок пилу і мікроорганізмів, що потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки. На виході із фільтру отримуємо вентиляційне повітря, яке надходить безпосередньо до виробничих приміщень.

ДР 4.2 Підготовка стерильного повітря.

Основним питанням технологічної гігієни є очищення повітря виробничих приміщень як можливого джерела забруднення. Цього можна досягти, використовуючи фільтри певної ефективності.

Повітря, яке подається в приміщення, має проходити чотири основні операції:

- стиснення повітря для подолання опору повітроводів та арматури;
- видалення пилу та інших частинок;
- видалення та знищення залишкових мікроорганізмів;
- регулювання температури та вологості.

ДР 4.2.1 Забір повітря

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

Забір повітря з атмосфери виконується за повітрозбірника за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10 м. Труби розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю.

ДР 4.2.2 Нагнітання та механічна очистка повітря

Під час проходження повітря під тиском через фільтр попередньої очистки, воно звільняється від частинок розміром більше 10 мкм, згідно діаметру пор фільтрувального паперу. Далі за допомогою насоса повітря нагнітається під тиском 0,2 МПа.

ДР 4.2.3 Очищення повітря на головному фільтрі

Після стабілізації у ресивері повітря надходить до загального фільтру типу НЕРА 11. Основне навантаження на видалення контамінантів мікробіологічного походження і механічних часток з діаметром менше 5 мкм припадає на головний фільтр.

ДР 4.2.4 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Фільтри тонкої очистки необхідні для уловлювання основних мас біологічних забруднень, що пропускаються іншими фільтрами, а також всіх інших можливих забруднень, які потрапили у систему випадково

Ці фільтри забезпечують ступінь очистки від мікроорганізмів і їхніх спор до 99,999%. Для індивідуальних фільтрах використовують спеціальні фільтруючі матеріали. До них відносять глибинні фільтри, патронні або фланцеві.

В процесі очистки повітря на індивідуальному фільтрі контролюють тиск у системі, а також перепади тиску, які можуть свідчити про мікробну контамінацію або наявність механічних часточок. Після очистки на індивідуальному фільтрі типу ФТО-60 стерильне повітря надходить до інокулятора та ферментеру для аерації культури продуценту.

ДР 5. Підготовка поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

Спочатку в колбах (1 л) готували дріжджеполісахаридне живильне середовище наступного складу, %: кукурудзяне борошно 1,5-2; кормові дріжджі 3,0; $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 0,5-0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02-0,04; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,15-0,20; вода водопровідна до 100.

За допомогою лугу (10% NaOH) доводять рН середовища до 7,4-7,8. Після цього живильне середовище розливають по 30-50 мл в колби Ерленмейера ємністю 750 мл і стерилізують протягом 40 хв при 120-122 °С. Після стерилізації рН середовища становило 6,8-7,2. Підготовлене живильне середовище охолоджували для засіву культурою штаму *B.thuringiensis* Н₁800/15.

На цьому етапі проводиться контроль мікробіологічної чистоти середовища.

ДР 5.2. Підготовка та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

В якості поживного середовища для біосинтезу використовують дріжджеполісахаридне середовище, оптимального складу, тобто на основі кормових дріжджів і кукурудзяного борошна (склад зазначений нище).

Склад поживного середовища для виробничого біосинтезу:

При цьому спочатку в водопровідну воду, нагріту до 40 ° С, засипали при постійному перемішуванні всі інші інгредієнти, отриману суспензію нагрівали до 80 ° С і витримували протягом 30 хв, після чого рН доводили до 7,8-8,0 і середовище стерилізували протягом 1 год при 140 ° С.

Простерелізоване живильне середовище для ферментера охолоджували до 30-35 ° С

ТП6. Одержання посівного матеріалу.

Для отримання посівного матеріалу використовують науковий музейний культурологічний продуцент.

Така виробнича культура має паспорт, в якому вказується його колекційний номер, серія та дані, що випускаються, середня активність серії та тривалість годівлі. У паспорті представлена характеристика середовища

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

для вирощування та зберігання культури. Посівний матеріал підлягає ретельному мікробіологічному і біохімічному контролю, оскільки як від його активності і чистоти залежить подальший виробничий цикл.

*ТП 6.1. Відновлення музейної культури *B.thuringiensis* H₁ 800 / 15.*

Вихідну культуру в стерильних умовах висівають у стерильні пробірки з поживним середовищем та інкубують в термостаті при температурі 28-30°C протягом 120 годин. Після цього оцінюють культуральні особливості: візуально – розмір та форму, краї та поверхню, колір та прозорість колоній, мікроскопічні й морфологічні ознаки продуценту, перевіряють мікробіологічну чистоту.

ТП 6.2 Одержання культури I генерації у колбах

Для засіву середовища в колбах служить спорова культура штаму *B.thuringiensis* H₁ 800 / 15, отримана змивом 5-10 мл фізрозчину на пробірку з культурою на скошеному агарі. Отриману суспензію з культурою штаму збовтують до отримання гомогенної суспензії і вносять в колби з підготовленим поживним середовищем із розрахунку 0,3-0,5 мл суспензії на 30-50 мл поживного середовища. Засіяні колби закріплюють на качалку при обертанні 200-220 об/хв і температурі 28-30 ° С на 56-72 год до повного сходження спор та отримання кристалів ендотоксину (перевірку здійснювали міроскопіюванням). Вирощену в колбах культуральну рідину використовували для засіву середовища в інокуляторі.

Контроль мікробіологічної чистоти посівного матеріалу на цьому етапі проводиться візуально.

ТП 6.3. Одержання культури II генерації в інокуляторі

Колби з посівним матеріалом після інкубування стерильно переміщують в малий посівний апарат – інокулятор, що містить простерилізоване поживне середовище.

Процес в інокуляторі відбувається при за температури 28-30°C, який забезпечує відповідний температурний режим подачею води технічної

					ЛБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

гарячої в сорочку апарата, протягом 72 годин. Посівний інокулятор обладнаний механічним перемішуючим пристроєм – відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання 220 об/хв та барботером, що забезпечує значну аерацію стерильним повітрям (0,5 об'єм повітря на 1 об'єм рідини за хвилину).

ТП 7. Виробниче культивування

Культуру вирощують глибинним способом методом періодичного культивування в біореакторі об'ємом 1000 л на дріжджеполісахаридному середовищі. Біореактор обладнаний паровою рубашкою, приладами для вимірювання та регулювання температури, рН середовища, концентрації розчиненого кисню і культуральної рідини. Крім цього, біореактор оснащений спеціальними опціями для подачі поживного середовища і вуглеводів, введення інокулята, подачі розчинів. Для перемішування ферментер оснащений механічною мішалкою зі швидкістю обертання до 220 об/хв.

ТП 7.1. Заповнення ферментеру поживним середовищем.

Приготоване на ДР 4.1. поживне середовище, в об'ємі 700 л вносять у ферментер протягом 2 годин. Коефіцієнт заповнення складає 0,7. Процес є аеробним, асептичним.

Після охолодження простерилізованого середовища до температури культивування (29 ± 1) °С, в асептичних умовах, відбирають стерильну пробу для контролю стерильності поживного середовища

ТП 7.2 Внесення посівного матеріалу до виробничого ферментеру.

В асептичних умовах в ферментер, що містить поживне середовище, вносять посівний матеріал (1 % від об'єму середовища) протягом 0,3 години.

ТП 7.3 Культивування

Ферментером для виробничого біосинтезу є циліндрична ємність об'ємом 1 м³ при коефіцієнті заповнення 0,7. Ферментер оснащений механічним перемішуючим пристроєм, що забезпечує необхідні умови для

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

проведення виробничого біосинтезу і створення потоків масо- і енергообміну.

Аерація здійснюється за допомогою вторинного диспергуючого пристрою барботеру, який розміщений під мішалкою, до якого через штуцер подається стерильне технологічне повітря.

У ферментері процес культивування проводиться при наступних умовах:

- температура культивування 28-30 ° С;
- швидкість обертання мішалки 200-220 об / хв;
- тиск в апараті 0,4-0,5 кгс / см²;
- режим подачі повітря в залежності від стадії споруляції:
 - з 0 до 12 год - 0,2 Vпов. / Vсеред / хв;
 - з 12 до 24 год - 0,5 Vпов. / Vсеред. / хв;
 - з 24 до 42 год - 0,8-1,0 Vпов. / Vсеред. / хв;
 - з 42 год - до закінчення ферментації - 0,5 Vпов. / Vсеред. / хв.

Тобто процес ферментації проводять в умовах високої аерації і закінчують при досягненні вмісту в отриманому препараті 90-95% вільних спор та кристалів ендотоксину при їх співвідношенні 1:1. При цьому титр клітин у отриманому препараті становить не менше 3,8-4,0 млрд.спор /мл при відсутності сторонньої мікрофлори і вірулентного фага [41].

ТП 8. Стабілізація культуральної рідини

Імобілізація токсинів здійснюється за рахунок утримання на поверхні носія молекул токсинів комплексу завдяки електростатичним, гідрофобним, дисперсійним взаємодіям або появі водневих зв'язків.

В якості наповнювача для ентомопатогенного комплексу використовують каолін з концентрацією 5%. Процес відбувається при температурі 28-32°C та триває від 30 до 45 хвилин.

Процес здійснюють у реакторі для імобілізації, в якості носія використовують каолін. Носій вносять у суспенсію біомаси та деякий час інкубують. Імобілізація здійснюється за рахунок осадження спор та їх

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

адсорбції на частинах носія. рН середовища контролюється за допомогою гідроксиду натрію[42].

ТП9. Наповнення бутилів

Технологічний процес ведеться в приміщенні класу чистоти D. Препарат розливають у бутилі ємністю 1л. Розлив препарату йде при постійному перемішуванні. Бутилі накриваються кришками і закупорюються, далі передаються на наступну стадію.

Контроль наповнення бутилів здійснюється автоматично на початку, всередині і наприкінці розливу. У разі невідповідності перевіряють калібрування дозуючого пристрою[45].

ПМВ 10. Пакування, маркування та відвантаження готового продукту

Фасування готової форми препарату відбувається на автоматичній лінії. Готовий препарат розливають в пластикові бутилі об'ємом 1л з похибкою не більше 1,5%, які потім запаюють і упаковують теромпластичну поліетиленову плівку по 10 шт.

На кожен бутиль наклеюють етикетку, що містить дані про упаковану продукцію:

- найменування підприємства-виробника та його товарний знак;
- найменування препарату;
- марка препарату;
- об'єм нетто;
- номер партії;
- дата виготовлення;
- призначення препарату;
- норми використання;
- термін зберігання;
- умови зберігання;
- позначення діючого стандарту.

					ЛБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

Продукт упаковують і маркують відповідно до вимог ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение»[46].

ЗВ 11. Знешкодження відходів та промислових викидів

В процесі виробництва утворюються відходи, які проходять стадії знезараження.

Миючі та дезінфікуючі розчини, які залишились від ДР1.2 та відпрацьовану воду направляють в збірник для нейтралізації стічних вод, де її розводять водою в 3-4 рази, встановлюють рН на рівні 7,0 за допомогою розчинів соляної кислоти або їдкого натрію, і зливають в загальнозаводську каналізаційну систему. Вентиляційне і нестерильне повітря знезаражують.

Залишки посівного матеріалу з посівного апарату та культуральної рідини з ферментеру піддають термічній обробці «гострою парою» ($t = 130^{\circ}\text{C}$, за тиску 0,2 МПа продовж 40 хвилин з подальшим охолодженням за допомогою холодної технічної води). Розводять соляною кислотою або розчином їдкого натрію до значення рН близько 7 та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, спецодягу, пакувального матеріалу утилізуються на міському сміттєзвалищі[47].

ПВ 12. Переробка відходів

Очищення повітря, яке містить живі клітини мікроорганізмів, залишки культуральної рідини із продуктами метаболізму передбачає присутність спеціального сепаратора для відділення крапель та піни із подальшою очисткою від клітин мікроорганізмів у скрубєрі і повторного використання у якості технологічного повітря.

Фільтрувальні матеріали можуть бути повторно використані на виробництві при їх відновленні: відмочують їх в гарячій воді, очищують та оброблюють дезінфікуючими розчинами.

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс ділянок приготування поживного середовища (700 л), виробничого культивування, стабілізації культуральної рідини, упаковки продукту для 1 серії готової продукції (1040 бутилів) по 1л.

Таблиця 4.4. Матеріальний баланс стадій виробництва біоінсектициду

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Розмірність			Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Розмірність		
	кг	Шт.	л		кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ДР 5.2							
Дріжджі кормові	21,32			Поживне середовище			700
Кукурудзяне борошно	14,21			Втрати			10,5
Амоній сульфат	1,42						
Калій фосфат	0,71						
NaCl	1,42						
MgSO4	0,71						
Крейда	1,07						
Кальцій хлорид	1,07						
Диамоній фосфат	1,42						
Вода			668,57				
Всього:	41,93		668,57	Всього:			710,5
	710,5				710,5		
Стадія ТП 7							
Поживне середовище дріжджеполісахари дне			700	Культуральна рідина			700
Посівний матеріал			7	Втрати			7
Всього:			707	Всього:			707
	707				707		

Стадія ТП8

Культуральна рідина			700	Стабілізований препарат			1050
Розчин наповнювачів			200	Втрати			18
Вода підготовлена			168				
Всього:			1068	Всього:			1068
		1068				1068	

Стадія ПМВ 10

Стабілізована культуральна рідина			1050	Готовий упакований препарат		1040	
Бутилі пластикові		1040				1040	
Пластикові пробки		1040				1040	
Етикетки		1040				1040	
Поліетилен пакувальний		104				104	
				Втрати			10
Всього:		3224	1050	Всього:		4264	10
		4274				4274	

4.5. Контроль виробництва

Для отримання якісної продукції готового препарату біоінсектициду, який відповідає всім зазначеним вимогам, здійснюється контроль стадій виробництва. Усі важливі контрольні точки наведено в табл. 4.5.

					ЛБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

Таблиця 4.5 Методи контролю при технологічному процесі

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка виробничого персоналу Км 1.1.	Чистота рук виробничого персоналу	Мікробіологічний	1раз/ 2тижні	Обробка рук дезінфікуючими засобами
	Мікробна контамінація			Не більше 200 КУО
ДР1.2 Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів Кт1.2	Концентрація робочого розчину	Методи аналітичної хімії	Кожну операцію	Не більше достимої межі 3%
ДР 1.2.1 Приготування розчину Дезактину Кх 1.2.1	Розчин Дезактину	Метод аналітичної хімії за НД	Кожну операцію.	C = 0,3 % T = 5 діб
ДР 1.2.2 Приготування розчину Біомою Кх 1.2.2	Розчин Біомою	Метод аналітичної хімії за НД	Кожну операцію	C = 0,5% T = 3 доби
ДР2 Підготовка виробничих приміщень, обладнання і комунікацій Кт,Кмб 2	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас Д: КУО<200.
	Справність обладнання	Провірка на герметичність		Зниження робочого тиску на 1-2%
ДР 2.1 Щоденне прибирання Кмб 2.1	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас Д: КУО<200.

Продовження таблиці 4.5

ДР 2.2 Генеральне прибирання Кмб 2.2	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас Д: КУО<200.
ДР3.1 Мийка та дезінфекція обладнання Кт,Кмб 3.1	Температура	Термометр,	Температура визначаються безперервно під час виробничого процесу	$\tau = 10$ хв $t = 100^{\circ}\text{C}$ $P = 0,5$ Мпа .
	контамінація	мікробіологічний метод	В кінці операції	КУО < 2
ДР 3.2 Технічний огляд та перевірка на герметичність Кт 2.2.	Ферментер, інокулятор	Манометр технічний	Тиск визначають безперервно під час перевірки на герметичність	$P = 0,15-0,2$ Мпа
ДР3.3 Стерилізація обладнання Кт,Кмб 4.3	Тиск	Манометр технічний	Кожну операцію	$P = 0,2$ Мпа
	температура	термометр, термоіндикатор		$t = 140^{\circ}\text{C}$ $\tau = 1$ год
ДР 4.1 Підготовка вентиляційного повітря Кт 4.1.3	вологість	психрометр	Протягом процесу	$W=40-60\%$
	Температура	Термометр		20°C

Продовження таблиці 4.5

ДР 4.2. Підготовка стерильного повітря Кт 4.2.4	Ступінь чистоти повітря	Метод визначення мікробної контамінації (проба повітря КУО/мЗ	Кожну операцію	99,99%
	температура	Термометр		30 °С
	тиск	манометр		Стале задане значення
ДР 5 Підготовка та стерилізація поживного середовищ Кт,Кх,Кмб 4.1 Кт,Кх,Кмб 4.2	Дозування компонентів	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Кінцева температура	термометр		35-40 °С
	Мікробіологічна чистота	мікробіологічний- мікроскопіювання		Відсутність сторонньої мікрофлори
	Параметри стерилізації	Термометр, манометр ,годинник		125°С, 0,1 МПа, 30 хв.
ДР 6 Одержання посівного матеріалу Кт,Кмб 6.1. Кт,Кмб 6.2. Кт,Кмб 6.3	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	t = 29±1 °С
	Тривалість культивування	Годинник		до 72 год
	Тиск в інокуляторі	Манометр технічний		0,1 МПа
	Мікробіологічна чистота	мікробіологічний- мікроскопіювання	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.5

ТП 7. Виробниче культивування Кт,Кмб 7.1 Кт,Кмб 7.2 Кт,Кмб 7.3	Мікробіоло- гічна чистота	мікробіологічний- мікроскопіювання	Постійно протягом процесу	Відсутність сторонньої мікрофлори
	температура	Термометр,		$t = 29 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$
	тиск у ферментері	манометр технічний		0,1 МПа
	тривалість культивування	годинник	Кожну операцію	35-40 год
ТП8 Стабілізація культуральної рідини Кмб,Кт 8	pH	pH-метр	Постійно протягом процесу	pH=6,8-7,2
	мікробіологічна чистота	мікробіологічний- мікроскопіювання		відсутність сторонньої мікрофлори
	Титр спор	мікробіологічний- мікроскопіювання		Не менше 1млрд/мл
ТП 9 Наповнення бутилів Кт 9	Об'єм у бутилі	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Автоматично	$V < 1\text{ л}$
ПМВ10 Маркування, пакування і відвантаження Кт 10	Кількість бутилів у термопластично му поліетилені	Візуально	Кожну операцію	$n = 10\text{ шт}$
ЗВ 11 Знешкодження відходів та промислових викидів Кт 11	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікро-біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм

Продовження таблиці 4.5

ПВ 12 Переробка відходів Кх 12, Кт 12	Наявність хімічних, механічних, мікро-біологічних забруднень	Кількісний хімічний та мікро-біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для даного матеріалу чи речовини
---	--	---	-------------------	---

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема представлена на окремому листі формату А1

					ПБ.БТ6212.00.000 .ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Ферментер для певного біотехнологічного процесу вибирають із врахуванням специфіки продуцента, властивостей поживного середовища і економічних міркувань.

Ферментер - це апарат, що здійснює гомогенізацію середовища у процесі мікробіологічного синтезу. Вони застосовується в біотехнологічній промисловості при виробництві лікарських і ветеринарних препаратів, вакцин, продуктів харчової промисловості та сільського господарства.

Виробничий ферментер має задовольняти наступні вимоги: необхідний об'єм, що забезпечує технологічний процес, а забезпечувати задану продуктивність та певний гідродинамічний режим руху реагентів, і створювати необхідну поверхню контакту взаємодіючих фаз, а найголовніше підтримувати необхідний теплообмін в процесі біосинтезу.

Конструкція ферментера визначається рядом факторів: агрегатний стан реагуючих речовин, інтенсивність перемішування реагентів, температура реакції і тиск, тепловий ефект і інтенсивність теплообміну, безперервність або періодичність процесу.[48]

На процес біосинтезу впливають також тип ферментера, його чистота, кількість вузлів, конструктивні особливості, коефіцієнт заповнення та багато інших елементів.

Тип ферментера, частота обробки внутрішніх стінок апарату та окремих його вузлів, коефіцієнт заповнення, поверхня теплопередачі, спосіб

					ДП.БТ6212.00.0000.ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ТА ПРОПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ		
Розробив		Павловський І.В.					
Консульт.		Фесенко С.В.					
Керівник		Тодосієвичук Т.С.					
Затвер.					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	60	96

відведення тепла, тип перемішуючого пристрою, керуючих пристроїв, арматура і запірні пристосування, спосіб піногасіння, - далеко неповний перелік окремих елементів, що впливають на процес біосинтезу.[49]

Найбільш важливу роль у виборі ферментера грає простота конструкції апарату і його економічна ефективність, тобто залежність його собівартості і складових частин ферментеру.

Ефективність роботи визначається перш за все необхідною інтенсивністю перемішування.

Мішалка – це рухомий робочий орган механічного перемішуючого пристрою, що здійснює перемішування рідких середовищ.[50]

Перемішуючий пристрій потрібний для збереження рівномірного температурного поля по всьому об'єму апарату, а також для своєчасного підведення і відведення поживних речовин і продуктів метаболізму до клітин, а також інтенсифікації масопередачі кисню.

Завданнями механічного перемішування рідин є:

- 1) створення однорідних розчинів, суспензій;
- 2) інтенсифікація процесів теплообміну;
- 3) інтенсифікація процесів масообміну.

За способом перемішування й аерації ферментери поділяються на апарати з механічним, пневматичним і циркуляційним перемішуванням. Апарати із механічним перемішуючими пристроями – найпоширеніший вид конструкцій в сучасній біотехнологічній промисловості. Вони оснащені механічним перемішуючим пристроєм, що складається із центрального вала й мішалок з лопатями різної форми. Апарати з механічними перемішуючими пристроями оснащують відбиваючими перегородками – вузькі металеві пластини, приварені до внутрішніх стінок реактора у кількості 4-6 штук на однаковій відстані одна від одної. Вони запобігають виникненню виру, перетворюючи круговий рух рідини в вихровий, який рівномірно розподілений по всьому об'єму. Застосування апаратів із механічним перемішуванням пов'язані із високою швидкістю масопередачі кисню та

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

поживних речовин й відносно малою потужністю. Конструктивним елементом, безпосередньо призначеним для приведення рідини у вихровий рух, є мішалка, що кріпиться на валу. Більшість завдань перемішування може бути успішно вирішене шляхом використання обмеженого числа конструкцій мішалок.

Перемішуючі пристрої у найбільш загальному випадку можна розділити на швидкохідні та тихохідні. До швидкохідних машалок належать пропелерні і турбінні мішалки різноманітних типів, а також спеціальні типи мішалок, (наприклад, дискові). Дані мішалки у залежності від форми лопатей та способу їх встановлення на валу здатні створювати радіальний, осьовий та радіально-осьовий потоки рідини в апараті.

Усі швидкохідні мішалки найчастіше усього потребують встановлення в апаратах відбиваючих перегородок для зменшення глибини воронки. Відсутність перегородок призводить до утворення в апараті виру великих розмірів, що зменшує ефективність всього процесу.

До тихохідних мішалок належать лопатеві, якірні, рамні. Вони здатні створювати коловий потік рідини, тобто рідина обертається навкруги осі апарата.[51]

Важливу роль при виборі мішалки відіграють фізичні параметри рідини, яка переміщується, найбільше на це впливає в'язкість середовища. Для малов'язких рідин, зазвичай, використовують швидкохідні мішалки, а для високов'язких – тихохідні. Для перемішування рідин із низькою та середньою в'язкістю використовують турбінні мішалки із прямими лопатками .

Для всіх ферментерів з механічними перемішуючими пристроями характерна наявність уніфікованого конструкційного елементу, який здійснює первинне диспергування газу. Функції такого диспергатора виконує барботер.[52]

Враховуючи усі аспекти для даного процесу було обрано в якості механічного перемішуючого пристрою – турбінна шестилопатєва мішалка у ферментері об'ємом 1 м^3 з барботером для диспергування середовища.

5.2 Технологічний , конструктивний , гідравлічний розрахунки.

Для проектування обраного біореактора проводиться конструктивний розрахунок, метою якого є визначення стандартних розмірів ферментеру та основних конструктивних елементів, що необхідні для технологічного процесу.

Мета теплового розрахунку полягала у визначенні поверхні теплообміну апарату і аналіз того чи вони здатні забезпечити відповідний режим. А також розрахований гідравлічний тиск , що діє на рухомі частини апарату .

Розраховані параметри ферментеру мають задовольняти всі вимоги проведення технологічного процесу та техніки безпеки, а також бути герметичним, надійним та зручним в експлуатації.

Конструктивний розрахунок

Номінальний об'єм апарату – 1 м^3 . Коефіцієнт заповнення (K_3) – 0,7.

За ГОСТ 20680-86 приймаємо внутрішній діаметр апарату:

$$D_{\text{вн}} = 1200 \text{ мм} = 1,2 \text{ м}$$

Висота корпусу:

$$H = 1100 \text{ мм} = 1,1 \text{ м}$$

Висота еліптичної частини днища:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}} = 0,25 \cdot 1,2 = 0,3 \text{ м}$$

Так як еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знайдемо решту конструктивних розмірів для днища апарату :

$$h_{\text{о.дн}} = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м} \text{ – висота основи еліптичного днища.}$$

$$S_{\text{дн}} = 6 \text{ мм} = 0,006 \text{ м} \text{ – товщина стінки еліптичного днища.}$$

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

$F_{\text{вн.дн}} = 1,65 \text{ м}^2$ – площа внутрішньої поверхні еліптичного днища.

$V_{\text{дн}} = 253,4 \text{ дм}^3 = 0,2534 \text{ м}^3$ – об'єм еліптичного днища.

$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел.дн}} + h_{\text{о.дн}} = 0,3 + 0,025 = 0,325 \text{ м}$ – повна висота днища.

Повний об'єм ферментера становить:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}}$$

Звідси об'єм циліндричної частини:

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 1 - 2 \cdot 0,2534 = 0,4932 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{0,4932 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,2^2} = 0,45 \text{ м}$$

Висота рідини в циліндричній частині:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4 \cdot K_3 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{4 \cdot 0,7 \cdot 0,4932}{3,14 \cdot 1,2^2} = 0,31 \text{ м}$$

Висота стовпа рідини в апараті:

$$H_{\text{р}} = H_{\text{рц}} + h_{\text{дн}} = 0,31 + 0,325 = 0,635 \text{ м}$$

Загальна висота ферментера без штуцерів, без опор:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 0,45 + 2 \cdot 0,325 = 1,1 \text{ м}$$

У якості перемішуючого пристрою вибираємо шестилопатеву турбінну мішалку відкритого типу .

За ГОСТ 6533-78 «Основні співвідношення розмірів перемішуючих пристроїв» для відкритої турбінної мішалки:

$$D/d_M = 3;$$

$$h_M/d_M = 0,2;$$

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

$$h/d_M = 0,4;$$

$$l/d_M = 0,25;$$

$$b/d_M = 0,1;$$

$$\xi_M = 8,4$$

Діаметр перемішуючого пристрою визначаємо за:

$$\frac{D}{d_M} = 3$$

$$d_M = \frac{D}{3} = \frac{1200}{3} = 400 \text{ мм}$$

За ГОСТ 20680-75 даний d_M є стандартним :

$$d_M = 400 \text{ мм}$$

Висота лопатей:

$$h_M = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,4 = 0,08 \text{ м}$$

Довжина лопаті:

$$L_L = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,4 = 0,1 \text{ м}$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 0,4 \cdot d_M = 0,4 \cdot 0,4 = 0,16 \text{ м}$$

Критерій опору: $\xi_M = 8,4$

Кутова швидкість:

$$\omega = \pi \cdot d_M \cdot n = 3,14 \cdot 0,4 \cdot 3,67 = 4,6 \text{ м/с}$$

$$n = 3,67 \text{ с}^{-1}$$

Для визначення чи необхідно встановити відбиваючі перегородки в апараті розрахуємо теоретичну глибину воронки:

Критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{\rho_p \cdot n \cdot d_m^2}{\mu_p}$$

$$Re = \frac{1004 \cdot 3,67 \cdot 0,4^2}{0,7 \cdot 10^{-3}} = 842,21 \cdot 10^3$$

Параметр висоти завантаження апарата Г:

$$\gamma(\Gamma) = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{0,635}{1,2} + 1 = 5,23$$

Параметр гідравлічного опору мішалки Е:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_m Re_c^{0,25}} = \frac{5,23}{8,4 \cdot 1 \cdot (842,21 \cdot 10^3)^{0,25}} = 0,02$$

де ξ_m – критерій опору мішалки ; z – к-ть мішалок на валу.

Глибина воронки у реакторі без відбиваючих перегородок становить :

$$h_b = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2} = \frac{10 \cdot 1^2 \cdot 0,4^2}{2} = 0,8 \text{ м}$$

де B – параметр, значення якого визначається із номограми у залежності від E та типу мішалку.

Так як, теоретично-розрахована глибина воронки є вище допустимого значення необхідне встановлення відбиваючих перегородок в апараті.

Розрахунок ширини перегородки:

$$b = 0,1 \cdot d_m = 0,1 \cdot 400 = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м}$$

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність приводу мішалки :

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N \cdot N_{\text{ущ}}}{\varphi}$$

де K_n – коефіцієнт, який указує на присутність у апараті відбиваючих перегородок ($K_n = 1$); K_H – коефіцієнт рівня рідини у апараті; K_i –

коефіцієнт, який враховує наявність у апараті внутрішніх пристроїв ($K_i = 1,1$); N – потужність, що витрачається на перемішування; $N_{уц}$ – потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки; φ – ККД двигуна ($\varphi = 0,85 - 0,9$).

Для визначення потужності, яка витрачається на перемішування потрібно визначити коефіцієнт K_n , що визначається у залежності від значення коеф. Рейнольдса:

$$Re = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{3,67 \cdot 0,4^2 \cdot 1004}{0,7 \cdot 10^{-3}} = 368,47 \cdot 10^3$$

При даному значенні Re коефіцієнт K_n для турбінної мішалки дорівнює 7.

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_n \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 7 \cdot 1004 \cdot 1^3 \cdot 0,4^5 = 71,97 \text{ Вт}$$

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевому ущільненні:

$$N_{уц} = 6020 \cdot d_v^{1,3} = 6020 \cdot 0,05^{1,3} = 122,53 \text{ Вт}$$

де d_v – діаметр валу мішалки.

Прийmemo вал діаметром 50 мм:

$$K_H = \left(\frac{H_p}{D} \right)^{0,5} = \left(\frac{0,635}{1,2} \right)^{0,5} = 0,73$$

Тоді:

$$N_{ел} = \frac{1 \cdot 0,73 \cdot 1,1 \cdot 71,97 \cdot 122,53}{0,9} = 7868 \text{ Вт} = 7,868 \text{ кВт}$$

Розрахунок барботеру

Для нашого апарату:

$$h_6 = 0,25 \cdot d_m$$

$$D_0 = (0,5 - 0,75) \cdot d_m$$

$$d_0 = 2 - 5 \text{ мм}$$

Діаметр на якому розміщенні отвори в барботері:

$$D_0 = (0,75 - 1) \cdot d_m = 0,75 \cdot 400 = 300 \text{ мм} = 0,3 \text{ м}$$

Відстань від мішалки до барботеру:

$$h_r = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 400 = 100 \text{ мм} = 0,1 \text{ м}$$

Згідно технологічного регламенту, на 1 од. об'єму культуральної рідини за 1 хв витрачається в середньому(враховуючи зміни у подачі повітря кожні 12 год) 0,5 одиниць об'єму повітря. Отже, на робочий об'єм 0,7 м³ витрати повітря складають 0,35 м³/хв = 0,06 м³/с.

Швидкість газу в отворах W_0 прийемо 25 м/с, тоді внутрішній діаметр барботеру:

$$d_{\text{бвн}} = \sqrt{\frac{4 \cdot V_r}{W_0 \cdot \pi}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,06}{25 \cdot 3,14}} = 0,055 \text{ м}$$

Середній діаметр барботера:

$$D_{\text{ср}} = 6 \cdot d_{\text{бвн}} = 6 \cdot 0,055 = 0,33 \text{ м}$$

Кількість отворів в барботері:

$$z = \frac{4 \cdot V_r}{W_0 \cdot \pi \cdot d_0^2} = \frac{4 \cdot 0,06}{25 \cdot 3,14 \cdot 0,003^2} = 340 \text{ шт}$$

де d_0 – діаметр газорозподільчих пристроїв ($d_0 = 3 \text{ мм}$)

Кількість отворів у одному ряду:

$$z_1 = \frac{\pi \cdot D_0}{t} = \frac{3,14 \cdot 300}{25} = 38 \text{ шт}$$

де t – крок поміж отворами (прийемо $t = 25 \text{ мм}$).

Кількість рядів на барботері:

$$n = \frac{z}{z_1} = \frac{340}{38} = 9$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} \cdot d_0^2 \cdot z = \frac{3,14}{4} 0,003^2 \cdot 340 = 0,0024 \text{ м}^2$$

Крок розміщення отворів:

$$\tau = \frac{\pi \cdot D_{\text{ср}}}{z} = \frac{3,14 \cdot 0,33}{340} = 0,003 \text{ м}$$

Тепловий розрахунок

Вихідні дані для розрахунку:

Живильне середовище

Дріжджеполісахаридне(3,5%)

Температура

живильного

$t_p = t_{\text{пс}} = t_{\text{пм}} = 29 \text{ }^{\circ}\text{C}$

середовища

Температура повітря

$t_{\text{пов п}} = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Тривалість культивування

$\tau = 36 - 48 \text{ год}$

Інтенсивність аерації

$V_r = 21 \text{ м}^3/\text{год}$

Теплоємність повітря

$C_{\text{пов}} = 1000 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$

Теплоємність води

$C_T = 4200 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$

Густина газу:

$$\rho_r = 1,29 \cdot \frac{273}{t_p + 273} = 1,29 \cdot \frac{273}{40 + 273} = 1,13 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

Теплоємність поживного середовища:

$$c_p = c_{пс} = c_{пм} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot x - t_{ср1})$$

$$= 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 3,5 - 40) = 4060 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

Густина поживного середовища:

$$\rho_p = \rho_{пм} = 1007,3 + 4,11 \cdot (x - 0,11 \cdot t_{ср1})$$

$$= 1007,3 + 4,11 \cdot (3,5 - 0,11 \cdot 40) = 1004,1 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища:

$$\mu_p = (2,7 + 0,192 \cdot x) \cdot t_{ср1}^{-0,426} = (2,7 + 0,192 \cdot 3,5) \cdot 40^{-0,426}$$

$$= 0,7 \cdot 10^{-3} (\text{Па} \cdot \text{с})$$

Коефіцієнт теплопровідності поживного середовища:

$$\lambda_{пс} = \lambda_{пм} = 0,512 + 0,00095 \cdot |t_{ср1} - 40| = 0,512 + 0,00095 \cdot |40 - 40|$$

$$= 0,512 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості поживного середовища:

$$\nu_{пс} = \nu_{пм} = \frac{\mu_p}{\rho_p} = \frac{0,7 \cdot 10^{-3}}{1004,1} = 0,697 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Маса повітря, що подається у реактор:

$$M_{пов} = \rho_{г} \cdot V_{г} = 1,09 \cdot 27 = 29,43 \text{ кг}$$

Маса рідини:

$$M_p = \rho_p \cdot V_p = 1004,1 \cdot 0,7 = 702,9 \text{ кг}$$

Маса посівного матеріалу:

$$M_{пм} = 0,01 \cdot M_{пс} = 0,1 \cdot 702,9 = 7,03 \text{ кг}$$

Маса поживного середовища:

$$M_{пс} = M_p - M_{пм} = 702,9 - 7,03 = 695,9 \text{ кг}$$

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

Надходження кількості теплоти в апарат:

- із поживним середовищем:

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{пс}} \cdot C_{\text{пс}} \cdot t_{\text{пс п}} = 695,9 \cdot 4060 \cdot 40 = 113 \text{ МДж}$$

- із посівним матеріалом:

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм п}} = 7,03 \cdot 4060 \cdot 30 = 0,856 \text{ МДж}$$

- із повітрям:

$$E_{\text{пов}} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов п}} = 29,43 \cdot 1000 \cdot 50 = 1,472 \text{ МДж}$$

- від повітря:

$$E_{\text{дис2}} = V_{\text{г}} \cdot \Delta p \cdot \tau = 27 \cdot 6254,9 \cdot 40 = 6,755 \text{ МДж}$$

$$\Delta p = \rho_p \cdot H_p \cdot g = 1004,1 \cdot 0,635 \cdot 9,81 = 6254,9 \text{ Дж}$$

- від двигуна мішалки

$$E_{\text{дис1}} = N \cdot \tau = 220 \cdot 40 \cdot 60 = 0,528 \text{ МДж}$$

Кількість сухих речовин становить у ПС:

$$702,9 \cdot 0,035 = 24,6 \text{ кг}$$

Вміст вуглеводів в складає 50%, тому:

$$1004,1 \cdot 0,50 \cdot 0,035 \cdot 0,7 = 12,3 \text{ кг вуглеводів}$$

Оскільки з 1 кг вуглеводів виділяється 3744 ккал тепла, то теплота реакції.

$$E_{\text{р}} = m_{\text{ц}} \cdot r = 12,3 \cdot 3744 \cdot 4,18 = 0,193 \text{ МДж}$$

Сумарна кількість надходження теплоти ферментера:

$$\begin{aligned} \sum E_{\text{надх}} &= E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов1}} + E_{\text{дис1}} + E_{\text{р}} \\ &= 113 + 0,856 + 1,472 + 0,528 + 0,193 = 116,05 \text{ МДж} \end{aligned}$$

- з теплоносієм

$$E_{\text{т1}} = M_{\text{т}} \cdot C_{\text{т}} \cdot t_{\text{т п}}$$

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

Витрати теплоти з парою:

- з культуральною рідиною

$$E_{кр} = M_p \cdot C_p \cdot t_p = 702,9 \cdot 4060 \cdot 30 = 85,613 \text{ МДж}$$

- з паром

$$E_{пари} = 0,1 M_p \cdot r = 0,1 \cdot 702,9 \cdot 2260 \cdot 1000 = 158,855 \text{ МДж}$$

r – теплота пароутворення, 2260 КДж/кг

- з повітрям

$$E_{пов2} = M_{пов} \cdot C_{пов} \cdot t_p = 29,43 \cdot 1000 \cdot 40 = 1,177 \text{ МДж}$$

- Втрати в навколишнє середовище

$$E_{втр} = 0,2(E_{кр} + E_{пари} + E_{пов2}) = 0,2 \cdot (85,613 + 158,855 + 1,177) = 49,13 \text{ МДж}$$

- Сумарні втрати:

$$\sum E_{втр} = E_{кр} + E_{пов2} + E_{пари} + E_{втр} = 85,613 + 1,177 + 158,855 + 49,13 = 294,78 \text{ МДж}$$

- з теплоносієм

$$E_{т2} = M_t \cdot C_t \cdot t_{тк}$$

Рівняння теплового балансу:

$$E_{пс} + E_{пм} + E_{пов1} + E_{дис1} + E_{дис2} + E_p + E_{т1} = E_{кр} + E_{пари} + E_{пов2} + E_{втр} + E_{т2};$$

$$E_{т1} - E_{т2} = M_t C_t (t_{т1} - t_{т2}) = E_{витр} - E_{надх};$$

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

$$E_{T1} - E_{T2} = 294,78 - 116,05$$

$$M_T C_T (t_{T1} - t_{T2}) = 178,73$$

$E_{\text{виптр}} > E_{\text{надх}}$, тоді середовище в апараті потрібно нагрівати.

$$t_{T \text{ ср}} = t_p + 10 \text{ }^{\circ}\text{C} = 40 + 10 = 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$t_{T1} = t_{\text{ср}} + 1 \text{ }^{\circ}\text{C} = 50 + 1 = 51 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$t_{T2} = t_{\text{ср}} - 1 \text{ }^{\circ}\text{C} = 50 - 1 = 49 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Тоді, звідси W_t :

$$M_T C_T (51 - 49) = 178,73;$$

$$M_T C_T = 89,365 \text{ МДж}$$

$$M_T = \frac{M_T C_T}{C_T} = \frac{89\,365\,000}{4200} = 21\,277 \text{ кг}$$

$$G_T = \frac{M_T}{\tau \cdot 3600} = \frac{21277}{40 \cdot 3600} = 0,148 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

$$W_T = \frac{G_T}{1000} = \frac{0,148}{1000} = 0,148 \cdot 10^{-3} \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

Розрахунок параметрів тепловіддачі і теплопередачі

Для визначення дійсної поверхні теплообміну необхідно знайти коеф. тепловіддачі від теплоносія в сорочці і від середовища в посівному апараті, а також коефіцієнт теплопередачі.

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія через стінку апарату:

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{\text{ст}} - D}{2}$$

де $\delta_{\text{ст}} = 0,006 \text{ м}$ – товщина стінки, $D_c = 1,3 \text{ м}$ – діаметр рубашки ферментера,

$$a = \frac{1,3 - 2 \cdot 0,006 - 1,2}{2} = 0,044 \text{ м}$$

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,044 = 0,116 \text{ м}$$

Еквівалентний діаметр становить:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,044 \cdot 0,116}{0,044 + 0,116} = 0,064 \text{ м}$$

Середній діаметр ферментера становить:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a = 1,3 - 0,044 = 1,256(\text{м})$$

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{d_m}{v_c} (n d_m + 4 W_r)$$

$$W_r = \frac{4V_r}{\pi D^2} = \frac{4 \cdot 0,06}{3,14 \cdot 1,2^2} = 0,053 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

Тоді:

$$Re_c = \frac{0,4}{0,697 \cdot 10^{-6}} (3,67 \cdot 0,4 + 4 \cdot 0,053) = 9,64 \cdot 10^5$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c}$$

$$Pr_c = \frac{0,7 \cdot 10^{-3} \cdot 4060}{0,512} = 5,55$$

Тоді:

$$Nu_c = 1,35 \cdot (9,64 \cdot 10^5)^{0,59} \cdot 5,55^{0,38} = 8785$$

Звідси знаходимо коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини в ферментері :

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D} = \frac{8785 \cdot 0,512}{1,2} = 3748 \text{ (Вт/м}^2 \cdot \text{К)}$$

Визначимо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія до поживного середовища:

Об'ємні витрати теплоносія на с :

$$V_T = \frac{G_T}{\rho_T} = \frac{0,148}{996} = 0,000149 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

де $\rho_T = 996 \text{ кг/м}^3$ – густина теплоносія при температурі $t_T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$

Швидкість руху теплоносія становить:

$$W_T = \frac{V_T}{ab} = \frac{0,000149}{0,044 \cdot 0,116} = 0,029 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

Знаходимо критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T d_{\text{екв}}}{\nu_T} = \frac{0,029 \cdot 0,064}{0,805 \cdot 10^{-6}} = 2306$$

де $\nu_T = 0,805 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ – кінематична в'язкість теплоносія за температурі $t_T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$

Так як $Re_T < 10000$, то критерій Нуссельта визначаємо за цим критеріальним рівнянням:

$$Nu_T = 0,037 Re_T^{0,8} \cdot Pr_T^{0,43}$$

Знаходимо критерій Прандтля:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot c_T}{\lambda_T} = \frac{0,802 \cdot 10^{-3} \cdot 4174}{0,618} = 5,42$$

де $\mu_T = 0,802 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$ – коефіцієнт динамічної в'язкості теплоносія за температурі $t_T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$,

$c_T = 4174 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність води при $t_T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$,

$\lambda_T = 0,618 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$ – питома теплопровідність води при $t_T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

Тоді:

$$Nu_T = 0,037 \cdot (2306)^{0,8} \cdot 5,42^{0,43} = 37,5$$

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія в рубашці становить:

$$\alpha_T = \frac{Nu_T \lambda_T}{d_{\text{екв}}} = \frac{37,5 \cdot 0,599}{0,064} = 350,98 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}} = \frac{1}{\frac{1}{3748} + \frac{0,006}{16} + \frac{1}{350,98}} = 285,7 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

де $\lambda_{\text{ст}} = 16 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$ – теплопровідність стінки.

Розрахована(теоретична) поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{ср}} \cdot \tau_{\text{пр}}} = \frac{178,73 \cdot 10^6}{285,7 \cdot 10 \cdot 40 \cdot 3600} = 0,45 \text{ м}^2$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_d = \pi D H_c$$

$$H_c = H_p - h_{\text{дн}} = 0,635 - 0,325 = 0,31 \text{ м}$$

Тоді:

$$F_d = 3,14 \cdot 0,31 \cdot 1,2 = 1,16 \text{ м}^2$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$F_p < F_d$$

$$0,45 \text{ м}^2 < 1,16 \text{ м}^2$$

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

Поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечує заданий температурний режим протягом його роботи.[53]

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

1. Насос відцентровий секційний ЦНСк 5-20

Насоси ЦНС - відцентрові багатосекційні з нержавіючої сталі призначені для подачі технічних рідин різних вязкостей і температур (вода, молоко, пиво, соки, миючі засоби, соняшникова олія та ін.).

Показники яких не виходять за дані рамки:

- Механічні домішки не більше 0,2% за обсягом
- Розміром частинок не більше 0,2 мм
- Температурою від -40 ° С до + 250 ° С
- В'язкість до $10^{-4} \text{ м}^2 / \text{с}$
- Густина середовища від 500 до 1500 кг / м^3 ;

Технічні характеристики:

- Продуктивність - 5 $\text{м}^3 / \text{год}$;
- Напор - 20 метрів;
- Потужність електродвигуна - 1,5 кВт;
- Матеріал проточної частини - нержавіюча сталь 12х18Н10Т
- Ущільнення насоса – торцеве[54].

2.Шестерний насос ШНК-9 (ШНК-9КР)

Шестерні насоси серії ШНК застосовуються для перекачування рідких продуктів з температурою від 20 до 90 ° С, в'язкістю до 505 $\text{см}^2 / \text{с}$ і щільністю до 1450 кг / м^3 . Шестерні насоси бережно обробляють продукт і мають мінімальний вплив на нього.Проточна частина цих насосів може бути виконана як з чавуну, так і з латуні.

Технічні характеристики:

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

- Продуктивність - 1,8 куб.м. / год
- Номінальний тиск нагнітання (натиск) - 0,85 МПа
- Матеріал проточної частини - латунь
- Потужність двигуна, залежно від моделі - 1,5 кВт
- Частота обертання двигуна - 1420 об / хв
- Маса - 200 кг
- Габаритні розміри - 1025x400x460 мм[54].

3.Вентилятор відцентровий Турбовент ВРМ-80/1 М

Серія відцентрових радіальних вентиляторів ВРМ може використовуватися в різних цілях: вентиляція промислових і побутових приміщень, обдув (охолодження) різного устаткування тощо.

Конструктивні особливості: корпус - листова сталь, крильчатка - динамічно збалансована з оцинкованої сталі, з назад загнутими лопатями. Двигун - однофазний асинхронний в міцному металевому корпусі (сталь / алюміній), підшипники кочення забезпечують тривалий період експлуатації, клас захисту двигуна - IP 44.

Технічні характеристики:

- Продуктивність - 90 м³ / год
- Тиск - 160 Па
- Споживана потужність - 40 Вт
- Обороти двигуна - 2500 об / хв[54].

4. Повітрозбірник(ресивер) Р-500

Ресивер - це апарат, який працює під тиском, і слугує для згладжування потоків тиску, що утворюються при нагнітанні повітря.

Повітряний ресивер Р -500/16 - ресивер вертикального виконання, призначений для зберігання стисненого повітря під тиском 10 бар. Дозволяє створювати додатковий запас стисненого повітря і може додатково грати роль конденсатовідвідника з магістральної лінії. Ресивер Р-500 вертикального виконання виконаний зі сталі СТ09Г2С, має температурний режим роботи: від мінус 20С ° до плюс 50 ° С і являє собою вертикальний

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

металеву зварну ємність об'ємом від 500 літрів з робочим тиском 10 бар. У комплект поставки ресивера входить: манометр, запобіжний клапан і кран зливу конденсату.

Технічні характеристики:

- Тип – вертикальний;
- форма днища – еліптична;
- Граничний робочий тиск - 10 бар(атм);
- стаціонарний обсяг - 500 л;
- Товщина стінки - 5 мм;
- Висота (без урахування опор і фланців) - 1850 мм;
- Внутрішній діаметр - 600 мм;
- Вага - 155 кг;[54].

5. Калорифер паровий ВНП 211

Повітронагрівачі призначені для нагріву повітря, повітряних сумішей або газів, в тому числі вибухонебезпечних. Дані апарати також можуть використовуватися в системах кондиціонування повітря, вентиляції, повітряного опалення, а також в різних технологічних процесах.

Калорифер може використовуватися в режимі повітронагрівача з температурою теплоносія до 300°C, також може використовуватися, як теплоутилізатор з температурою утилізованих газів до 300°C .

Повітронагрівачі, в залежності від того, який теплоносій в них використовується, підрозділяються на парові і водяні , і виготовляються двох-, трьох- і чотирирядні;

Схема руху теплообмінюючих середовищ - перехресно-точкова;

Умови експлуатації:

Гранично-допустимий вміст хімічно агресивних речовин в повітрі, що проходить через повітронагрівач, не повинно перевищувати значення, вказане в ГОСТ 12.1.005-88 з запиленістю не більше 0,5 мг / м³, що не містить липких речовин і волокнистих матеріалів; Нагрівач повітря не

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

повинен встановлюватися в місцях, створюють зовнішню вібрацію більше 2 мм / с;

Повітронагрівач призначений для експлуатації в умовах помірного і холодного клімату (УХЛ), категорія розміщення 3 - по ГОСТ 15150-69 без перевищення вологості;

Теплоносій - сухий насичений або перегрітий пар з параметрами: робочий тиск не більше 1,2 МПа, температура не більше 300°C .У парових повітронагрівачах водяна пара, не повинен містити крапельної вологи і за якістю та складом повинен відповідати ГОСТ 20995-75 і СНіП 11-36-76.

Повітронагрівачі ПНВ 211 виготовляються по ТУ У 29.2-25185354-004-2003

6. Масовий рідинний дозатор ДЖМ-1

Масовий дозатор призначений для дозування рідин та інших текучих речовин об'ємним способом у будь-яку готову тару або упаковку (бутель, банку, каністру). Устаткування працює в напіваавтоматичному режимі, та потребує від оператора встановлення тари, подачі команди на початок дозування, і приймання заповненої тари.

Технічні характеристики:

- Електроживлення, В / Гц - 220/50
- Встановлена потужність, кВт/год - 0,5
- Вага (не більше), кг - 6/50
- Довжина / Ширина / Висота (не більше), мм - 600 / 800 / 1600
- Продуктивність (макс.) *, л/год - 2500
- Діапазон дозування, мл - 200-необмежено[54].

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

**Загальні питання з охорони праці на підприємствах
мікробіологічної промисловості.**

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

Високі темпи розвитку мікробіологічної промисловості вимагають досить великої уваги до організації техніки безпеки, а також створення безпечних та безаварійних умов праці на біотехнологічних підприємствах. Працівник, що бере участь у виробничому процесі, потенційно піддається різноманітним видам небезпеки до яких відносять: контакти із хімічними і агресивними рідинами, високі температура та тиск у апаратах і трубопроводах. Таким чином, постійний контроль і дотримання технологічного регламенту, правил та норм техніки безпеки і виробничої санітарії – одна з умов, що гарантує безпеку. Основними складовими безпеки праці на виробництві є:

- безпека при роботі з виробничим обладнанням;
- безпечність технологічних процесів;
- організація безпечного виконання робіт працівниками

Вимоги безпеки до виробничого обладнання конкретних груп та моделей розробляються відповідно до вимог ГОСТ 12.2.003-91[55] із врахуванням призначення та умов його експлуатації. Безпека виробничого обладнання забезпечується наступними методами:

- вибором принципів дії, джерел енергії, параметрів робочих процесів;
- мінімізацією енергії, що споживається чи накопичується;
- застосуванням вмонтованих у конструкцію засобів захисту і інформації про можливі небезпечні ситуації;
- застосуванням засобів автоматизації, дистанційного керування та контролю;
- обмеженням фізичних і нервово-психологічних навантажень працівників.

Апарати з механічними перемішувачами для безпечної експлуатації повинні відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-91[57], ГОСТ 12.2.007.9-93 [56] і конструкторських документів для апаратів даного типу. Для забезпечення виконання вимог, що описані вище у проектованому апараті реалізований ефективний захист від перепаду тиску робочого

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		81

середовища через встановлення запобіжного клапану. Герметичність апарату забезпечується встановленням торцевого ущільнення і проведенням надійного електрозварювання та монтажу апарату, відповідно до ГОСТ 24444-87 [14]. Для захисту від перепадів напруги електричного струму апарат повинен бути обладнаний захисним заземленням, відповідно до ГОСТ 12.1.038-82 [57].

Заземлюючі пристрої, призначені для захисту апаратів від статичного струму, слід об'єднувати із заземлюючими приладами для електрообладнання. Температура зовнішніх поверхонь апаратів чи кожухів теплоізоляційних покриттів, які доступні для дотику із робочого місця обслуговуючого персоналу, не має перевищувати 45°C при встановленні апаратів всередині виробничих приміщень. Допустимий рівень звуку та еквівалентний рівень звуку на робочих місцях біля апарата, виміряний за шкалою шумоміра, згідно вимог не повинен перевищувати 80 дБ.

Відповідно до ДСТУ 2293-99, виробнича санітарія – це система організаційних, гігієнічних та санітарно-технічних заходів і засобів запобігання впливу на працівників шкідливих виробничих факторів. Сфера дії – запобігання професійній небезпеці, що може призвести до професійних чи професійно-обумовлених захворювань в тому числі і смертельних при дії у процесі роботи таких факторів як випромінювання електромагн. полів, іонізуючого випромінювання, вібрацій, шумів, хімічних речовин.

Охорона праці - система законодавчих актів і відповідних їм соціально-економічних, технічних, гігієнічних і організаційних заходів, що забезпечують безпеку, збереження здоров'я і працездатність людини у процесі виробництва. Питанням охорони праці приділяється особлива увага, тому що на цих підприємствах виробляються хімічні та мікробіологічні продукти: біологічно активні речовини (вітаміни, амінокислоти, білки та ферменти, дрі- жджі та ін.), а також широко використовують кислоти, луги, розчини солей, мікроорганізми, що викликає алергічні реакції у людини та

ряд інших захворювань. Крім того, багато речовин є пожежо- та вибухонебезпечні[59].

На виробництві повинен проводитись регулярний і суворий контроль наявності у повітрі токсичних і хімічних речовин. В виробничому приміщенні інколи виникають несприятливі умови через недотримання оптимальних параметрів вологості, температури, тепловиділення, яке спричинено поганою вентиляцією або надмірним тепловим випроміненням апарату. Дані фактори знижують працездатність і ефективність праці персоналу, за рахунок чого підвищується втомлюваність і потовиділення, яке призводить до підвищеної втомлюваності.

Створення оптимальних параметрів роботи досягається за рахунок автоматизації процесу кондиціювання і вентиляції всіх приміщень. Апарати, що випромінюють тепло мають бути накритими відповідними теплоізоляційними матеріалами.

Працювати мають право лише робітники, що пройшли інструктаж з техніки безпеки і мають досвід роботи із обладнанням. Робота повинна проводитися лише на справному обладнанні, за наявності кожухів на вузлах, які обертаються та при обов'язковому заземленні обладнання. Згідно із розробленим виробчим регламентом періодично проводиться перевірка відповідності практичних показників до тих, що встановлені нормами. Безпека умов праці залежить від термінів проведення планово-технічних ремонтів, зовнішнього і внутрішнього огляду приміщення, а також огляду обладнання під час планових та капітальних ремонтів. Перенесення термінів планово-технічних ремонтів є повністю неприпустимим. Подібне недотримання термінів доволі часто призводить до жахливих аварій, що легше попередити ніж ліквідувати [58].

Очищення стічних вод

Технологічний процес біотехнологічного виробництва пов'язаний із споживанням значної кількості води, яка забруднюється шкідливими мікроорганізмами, мінеральними солями і органічними компонентами. В

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

стічних водах знаходяться як і розчинні, так і нерозчинні речовини. Рівень забрудненості стічних вод оцінюється двома показниками: хімічним споживанням кисню (ХСК), тобто кількістю кисню (мг), яка достатня для окиснення речовин в 1 дм³ стоків, і біологічним споживанням кисню (БСК), тобто кількістю кисню (мг), яку споживають мікроорганізми на окиснення органічних речовин в 1 дм³ стічних вол. Величину споживання кисню протягом 5 днів позначають БСК₅.

Існує декілька промислових способів очищення стоків:

- *механічне очищення* (від нерозчинних у воді забруднень) використовують решітки, сита, гідроциклони, відстійники, піщані і сітчасті фільтри. Гідроциклони використовують для освітлення поживних середовищ, нейтралізаторів;
- *хімічне очищення*. Відбувається шляхом додавання до стоків реактивів для осадження домішок або виділення газів;
- *фізико-хімічне очищення* (включає в себе процеси коагуляції, флокуляції, сорбції та флотації). Як коагулятори застосовують сульфат алюмінію, а також широко використовують сорбцію (в якості сорбента - активоване вугілля);
- *біологічне очищення* ґрунтується на хімічному перетворенні та утилізації мікроорганізмами органічних речовин, які містяться в стоках[59].

Очищення повітряних викидів

Очищення повітря від газових шкідливих домішок за такими 5 основними хіміко-технологічними групами методів: адсорбцією, абсорбцією, хемосорбцією, термічною нейтралізацією та каталізацією.

Абсорбція використовується у тих випадках коли очищенню підлягають газові потоки, такі як - пари соляної кислоти, аміак, оксид сірки чи оксид вуглецю. Суть цього методу полягає в поглинанні абсорбентами (рідинами) полютантів, шляхом розчинення чи зв'язування газів, які проходять через них.

Адсорбція - метод очистки , який базується на властивостях окремих адсорбентів - активного вугілля, цеолітів, гонкодисперсних твердих тіл (адсорбентів силікагелів і т.д.) вловлювати в газах за певних умов шкідливі елементи.

Метод хемосорбції базується на поглинанні газів твердими і рідкими поглиначами з утворенням слаболетких або слабозрочинних хімічних сполук, що у результаті побічних реакцій дозволяє отримати корисний кінцевий продукт (наприклад при вилученні з газів сірководню отримують сірку за допомогою мишьяколуужного розчину) для цього дуже часто використовують скрубери Вентурі .

Термічна нейтралізація – цей етод базується на здатності горючих токсичних компонентів (газу чи пари) окислятися до менш токсичних сполук за наявності вільного кисню та високої температури газової суміші. Метод використовується у випадках, якщо об'єми та концентрація викидів великі.

Каталітичний метод використовується для перетворення досить токсичних компонентів промислових викидів в речовини нешкідливі або менш шкідливі для довкілля шляхом уведення в систему додаткових каталізаторів. Метод базується на взаємодії речовин, яка видаляється з одним із компонентів, що присутній в газі, яку очищує, чи з спеціально доданою в суміш речовиною. Каталізатор взаємодіючи з одним із реагуючих сполук, дозволяє утворити проміжну речовину, яка розкладається із утворенням кінцевого продукту та регенованого каталізатора.

На основі вищезгаданих методів розроблена багато пристроїв та апаратів, при комплексному використанні яких може бути досягнуте високоефективне очищення пилогазових викидів. З метою економного використання площ виробничих приміщень дані пристрої й апарати розміщують, як правило, у верхніх ярусах цеху. Вилучені із пилогазових викидів речовини звичайно є готовим продуктом чи коштовним видом вторинної сировини[59].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		85

ВИСНОВКИ

1. В проекті для виробництва біоінсектициду було обрано продуцент *B.thuringiensis* H₁800/15, так як зазначений штам володіє підвищеним рівнем синтезу дельта-токсину, проявляє стійкість до дії бактеріофагів, та не викликає резистентності у комах, які піддаються його впливу.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів ентомопатогенних препаратів та запропоновано схему отримання продуценту із застосуванням індукованого мутагенезу. Як мутаген було обрано гамма-випромінювання. Довжина гамма-хвиль складає менше 0,1 нм, тривалість обробки – 60 с, виживаність складає 1-10%.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *B.thuringiensis* H₁800/15 було обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі кормових дріжджів та кукурудзяного борошна, а також визначені раціональні параметри культивування: температура 29±1°C, тривалість 35-40 год, рН підтримувати в межах 6,8–7,2, аерація - інтенсивна, зі зміною подачі кількості повітря.

4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для приготування поживного середовища з метою культивування продуценту було обрано і розраховано ферментер об'ємом 1000 л з коефіцієнтом заповнення 0,7 із шестилопатевою турбінною мішалкою у якості механічного перемішуючого пристрою та барботером для подачі повітря у ході промислового біосинтезу.

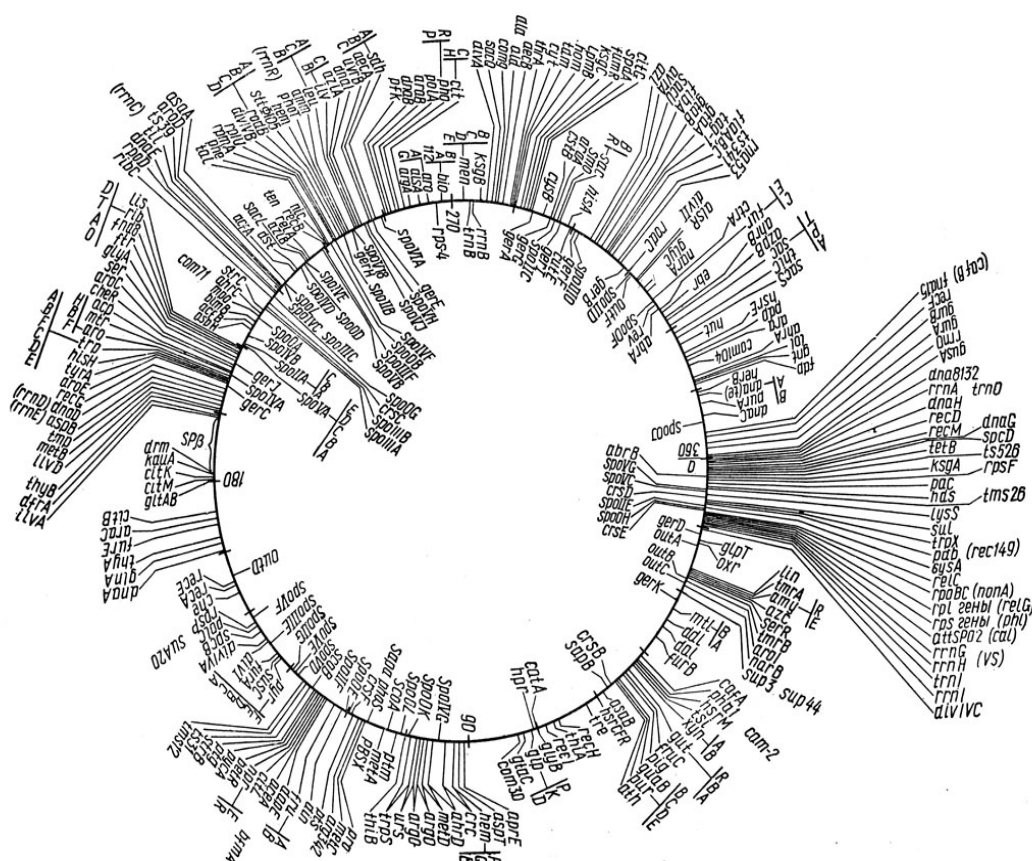
5. Запропоновано використання каоліну, карбоксиметилцелюлози та сульфанола, як компонентів наповнюючого та стабілізуючого середовища, що забезпечують збереження, сорбцію та захист компонентів культуральної рідини отриманої в процесі виробничого біосинтезу

					ДП.6212.00.000.ПЗ		
Зм.	Арж.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Поворозний І.В.			ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	86
							96
Керівник		Тодасіичук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

6. У відповідності до вимог готової форми препарату та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва біоінсектициду в бутилях об'ємом по 1л (титр не менше – 10^9 КУО/см³), які упаковані в термопластичний поліетилен по 10 штук.

					ДП.6212.00.000.ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		87

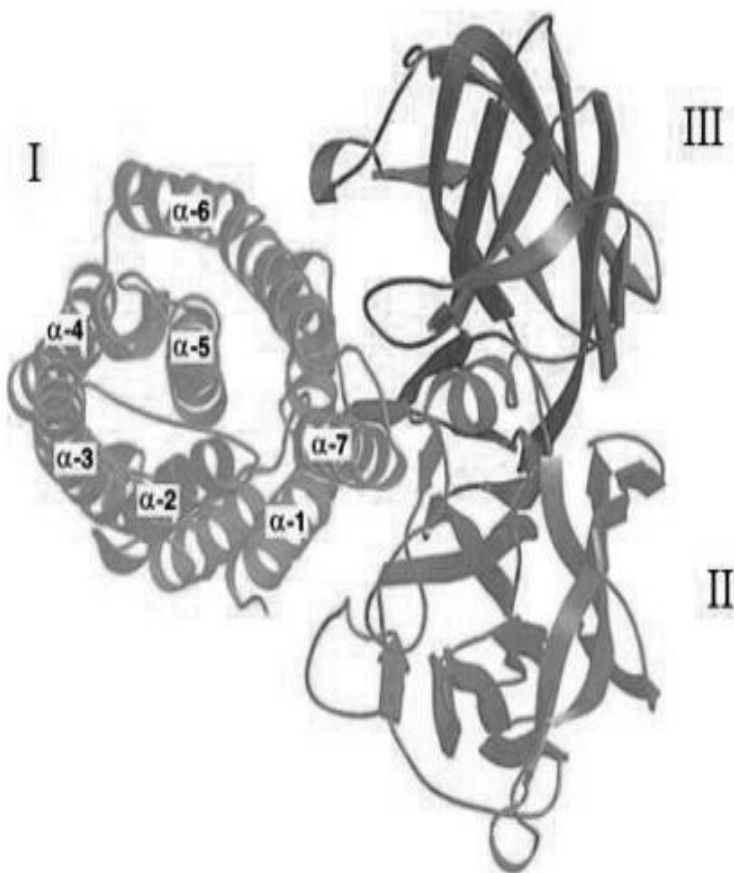
ДОДАТОК А



Кільцева генетична карта *B.subtilis*[60].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДОДАТОК А	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Поворотний ІВ.				Д	94	96
Консульт.								
Керівник		Тодосієвичук Т.С.						
Затвер.						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

ДОДАТОК Б



Третинна структура Crg3Aa і Crg1Aa δ -ендотоксинів [15]

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДОДАТОК Б	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Поворозний І.В.				Д	95	96
Консульт.								
Керівник		Тодосіючук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ДОДАТОК В

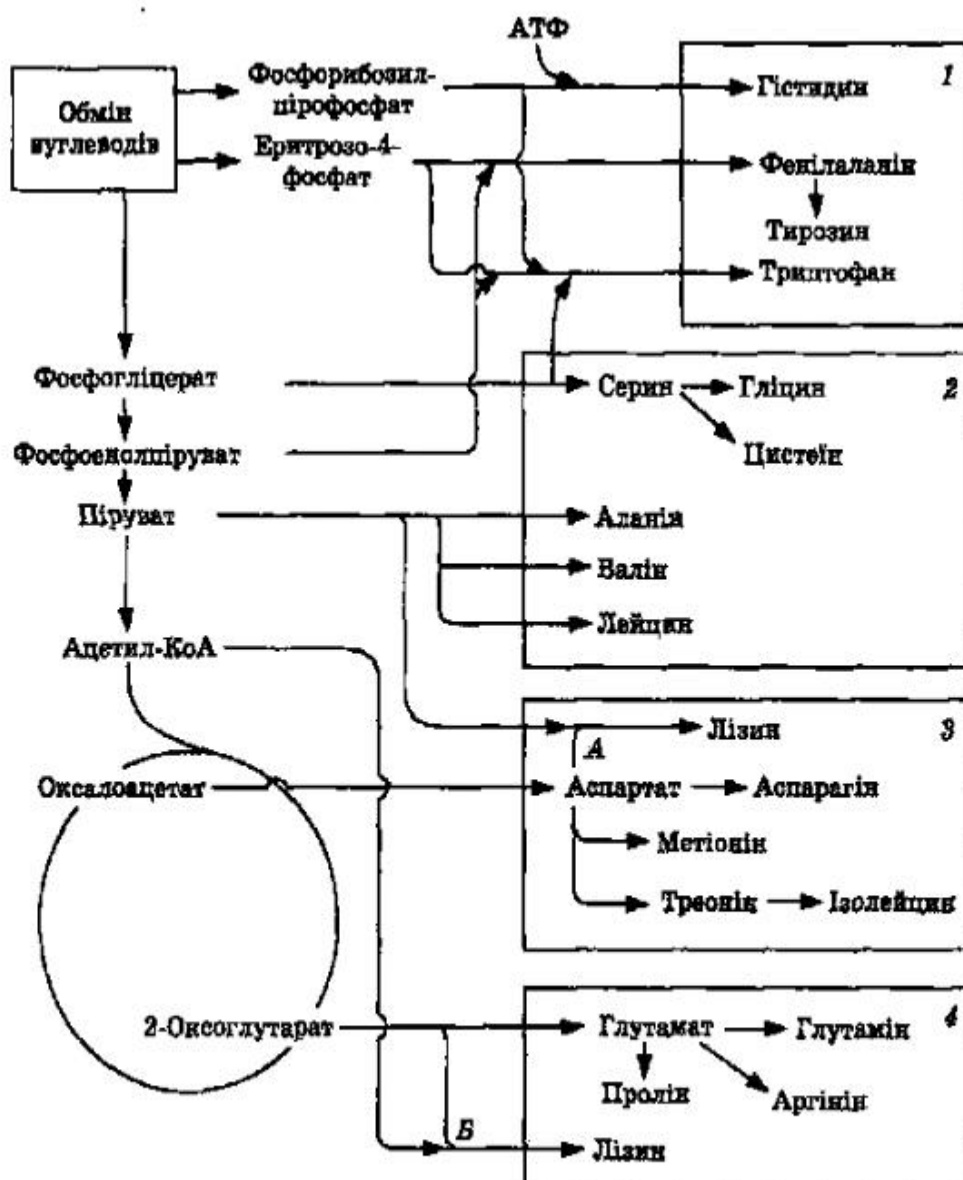


Схема метаболізму вуглеводів із утворенням α -амінокислот[57].

					ДП.БТ6212.00.000.ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Паворозний І.В.				ДОДАТОК В	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	96
Керівник	Тодосіючук Т.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							